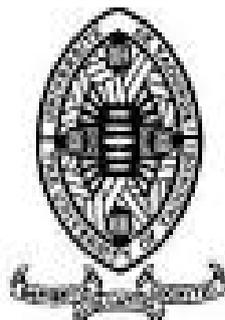


UNIVERSITE DE YAOUNDE I
THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTE DES SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE
LABORATORY OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY

**Effets immunomodulateurs et anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo*
de *Khaya grandifoliola* (Méliaceae) et d'*Entada africana* (Fabaceae)
en comparaison avec la Baicaline : Cas de la maladie d'Alzheimer**

THESE

Présentée et soutenue en vue de l'obtention du Doctorat/ PhD en BIOCHIMIE

Spécialité : Biotechnologie et Développement

Par :

OWONA AYISSI Vincent Brice

DEA en Biochimie Matricule :

02w130

Sous la supervision de

MOUNDIPA FEWOU Paul

Professeur

Année académique 2014-2015



REPUBLIQUE DU CAMERON
Paix-Travail-Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
B.P. 812 Yaoundé, Cameroon



REPUBLIC OF CAMEROON
Peace-Work-Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I
FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY
P.O.Box 812, Yaoundé, Cameroon

Yaoundé, le.....

ATTESTATION DE CORRECTION

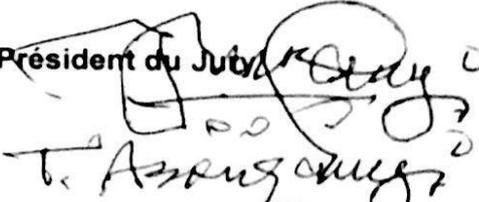
Nous soussignés, membres du Jury de la soutenance de thèse de Doctorat/PhD en Biochimie intitulée « Effet immunomodulateurs et anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo* de *Khaya grandifoliola* (Méliaceae) et d' *Entada africana* (Fabaceae) en comparaison avec la Baicaline: Cas de la maladie d' Alzheimer» de M. OWONA AYISSI Vincent Brice, matricule : 02W130, attestons que ce candidat a effectué les corrections exigées lors de cette évaluation faite en date du 16 Avril 2015.

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

Membres du Jury


A Venonique PENLOP BONO

Président du Jury


T. Assoungouga

Le Chef de Département de Biochimie


A. Assoungouga

LIST OF LECTURERS IN THE FACULTY OF SCIENCE
ANNÉE ACADÉMIQUE 2013/2014

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I FACULTÉ DES SCIENCES Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I FACULTY OF SCIENCE Division of Programming and follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS	LIST OF PERMENENT TEACHING STAFF	

ANNÉE ACADÉMIQUE 2014/2015

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 10 Février 2015

ADMINISTRATION

DOYEN: BILONG Paul, Professeur

VICE-DOYEN / DPSAA: NJOPWOUO Daniel, Professeur

VICE-DOYEN / DSSE: DONGO Etienne, Professeur

VICE-DOYEN / DRC: ESSIMBI ZOBO Bernard, Professeur

Chef Division Affaires Académiques, Etudes et Recherche: ABESOLO Monique,
Chargé de Cours

Chef Division Administrative et Financière: NDOYE FOE Marie C. F., Chargé de Cours

1-DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BCH) (41)			
N°	NOMS ET PRENOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	AMVAM ZOLLO Paul Henri	Professeur	<i>Recteur UN</i>
2	MBACHAM FON Wilfred	Professeur	<i>Chef de Dépt FMBS</i>
3	MOUNDIPA FEWOU PAUL	Professeur	<i>Chef de Département</i>
4	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
5	BENG née NINTCHOM PENLAP V.	Maître de Conférences	En poste
6	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
7	FEKAM BOYOM Fabrice	Maître de Conférences	En poste
8	FOKOU Elie	Maître de Conférences	En poste
9	KANSCI Germain	Maître de Conférences	En poste
10	MINKA Samuel	Maître de Conférences	En poste
11	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
12	ACHU Merci BIH	Chargé de Cours	En poste
13	ATOgho Barbara Mma	Chargé de Cours	En poste
14	BELINGA née NDOYE FOE Marie F.	Chargé de Cours	<i>Chef DAF/FS</i>
15	BIGOGA JUDE	Chargé de Cours	En poste
16	DEMMANO Gustave	Chargé de Cours	En poste
17	DJOKAM TAMO Rosine	Chargé de Cours	En poste
18	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Chargé de Cours	En poste
19	EFFA ONOMO Pierre	Chargé de Cours	En poste
20	EVEHE BEBANDOUE Marie-Solange	Chargé de Cours	En poste
21	EWANE Cécile Anne	Chargé de Cours	En poste
22	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Chargé de Cours	<i>CE SEP MINESUP</i>
23	NGONDI Judith Laure	Chargé de Cours	En poste
24	NJAYOU Frédéric Nico	Chargé de Cours	En poste
25	Palmer NIASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
26	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Chargé de Cours	En poste

27	WAKAM née NANA Louise	Chargé de Cours	En poste
28	AKINDEH MBUH NJI	Assistant	En poste
29	BEBEE FATIMATOU	Assistante	En poste
30	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Assistante	En poste
31	DAKOLE DABOY Charles	Assistant	En poste
32	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Assistante	En poste
33	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Assistant	En poste
34	FONKOUA Merlin	Assistant	En poste
35	KOTUE TAPTUE Charles	Assistant	En poste
36	LUNGA Paul KAILAH	Assistant	En poste
37	MANANGA Marlyse Joséphine	Assistant	En poste
38	MBONG ANGIE MOUGANDE Mary A.	Assistante	En poste
39	MBOUCHE FANMOE Marcelline Joëlle	Assistante	En poste
40	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Assistant	En poste
41	TIENTCHEU DJOKAM Leopold	Assistant	En poste
2-DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALE (B.P.A) (45)			
1	BILONG BILONG Charles Félix	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
3	FOMENA Abraham	Professeur	En poste
4	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
5	MIMPFONDI REMY	Professeur	En poste
6	NGASSAM Pierre	Professeur	En poste
7	NJILOKOU Flobert	Professeur	En poste
8	NOLA Moïse	Professeur	En poste
9	TCHUEM TCHUENTE Louis	Maître de Conférences	<i>Coord. Progr. MINSANTE</i>
10	DJIETO Lordon Champlain	Maître de Conférences	En poste
11	DZEUFIEI'DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
12	ESSOMBA née NTSAMA MBALLA	Maître de Conférences	<i>Chef dépt FMSB</i>
13	FOTO MENBOHAN Samuel	Maître de Conférences	<i>CT₂ MIN. ENERGIE</i>
14	KAMGANG René	Maître de Conférences	<i>C. S. MINRESI</i>
15	NJAMEN Dieudonné	Maître de Conférences	En poste
16	TAN Paul	Maître de Conférences	En poste
17	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Maître de Conférences	En poste
18	AJEAGAH Gidéon AGHAINDOUM	Chargé de Cours	En poste

19	ALENE Désirée Chantal	Chargé de Cours	En poste
20	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
21	BILANDA Danielle Claude	Chargé de Cours	En poste
22	DJIOGUE Séfirin	Chargé de Cours	En poste
23	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargé de Cours	En poste
24	JATSA MEGAPTCHE Hermine	Chargé de Cours	En poste
25	KEKEUNOU Sévilor	Chargé de Cours	En poste
26	MEGNEKOU Rosette	Chargé de Cours	En poste
27	MONY NTONE Ruth	Chargé de Cours	En poste
28	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Chargé de Cours	En poste
29	NGUEMBOCK	Chargé de Cours	En poste
30	TOMBI Jeannette	Chargé de Cours	En poste
31	ATSAMO Albert Donatien	Assistant	En poste
32	ETEME ENAMA Serge	Assistant	En poste
33	KANDELA KAVAYE Antoine	Assistant	En poste
34	KOGA MANG'DObara	Assistant	En poste
35	LEUKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Assistant	En poste
36	MAHOB Raymond Joseph	Assistant	En poste
37	MBENOUN MASSE Paul Serge	Assistant	En poste
38	MOUNGANG NGAMENI Luciane	Assistant	En poste
39	MUH Benrnicie FIEN	Assistant	En poste
40	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Assistant	En poste
41	NGOULATEU NDANKEU Yves Patrick	Assistant	En poste
42	NJUA Clarisse YAFI	Assistante	En poste
43	OBI OBEN Esther	Assistante	En poste
44	TADU Zéphirin	Assistant	En poste
45	YEDE	Assistant	En poste
3-DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALE (B. P. V) (27)			
1	YOUMBI Emmanuel	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	AMBANG Zachée	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / FSE</i>
3	BELL Joseph Martin	Maître de Conférences	En poste
4	DJOCGOUE Pierre François	Maître de Conférences	En poste
5	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
6	MOSSEBO Dominique Claude	Maître de Conférences	En poste

7	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE/MINRESI</i>
8	ZAPFACK Louis	Maître de Conférences	En poste
9	ANGONI Hyacinthe	Chargé de Cours	En poste
10	BIYE Elvire Hortense	Chargé de Cours	En poste
11	MALLA Armand William	Chargé de Cours	En poste
12	MBARGA BINDZI Marie Alain	Chargé de Cours	<i>Insp. Services MINESUP</i>
13	MBOLO Marie	Chargé de Cours	En poste
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Chargé de Cours	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Chargé de Cours	En poste
16	NGOOU Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
17	NSOM ZAMO Annie Claude	Chargé de Cours	<i>Expert national / UNESCO</i>
18	TONFACK Libert Brice	Chargé de Cours	En poste
19	TSOATA Esaïe	Chargé de Cours	En poste
20	DJEUANI Astride Carole	Assistante	En poste
21	GONMADGE Christelle	Assistante	En poste
22	MAHBOU SOMO TOUKAM Gabriel	Assistante	En poste
23	MAFFO MAFFO Nicole	Assistante	En poste
24	NGALLE Hermine BILLE	Assistante	En poste
25	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Assistante	En poste
26	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Assistante	En poste
27	ONANA Jean Michel	Assistant	En poste
4-DEPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (C.1.) (37)			
1	KETCHA MBADCAM Joseph	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
3	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>Directeur MINESUP</i>
4	NJOPWOUO Daniel	Professeur	<i>Vice-Doyen / DPSAA</i>
5	AGWARA ONDOH Moïse	Maître de Conférences	<i>Insp Génér. MINPMEA</i>
6	AVOM Jérôme	Maître de Conférences	<i>Directeur IAI Gabon</i>
7	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée mission P.R.</i>
8	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
9	ELIMBI Antoine	Maître de Conférences	En poste
10	GHOGOMU Paul MINGO	Maître de Conférences	<i>Directeur Cabinet PM</i>
11	LAMINSI Samuel	Maître de Conférences	En poste
12	MELO née CHINJE Uphie F.	Maître de Conférences	<i>Directeur Mipromalo</i>

13	NANSEU Charles Péguy	Maître de Conférences	En poste
14	NENWA Justin	Maître de Conférences	En poste
15	NDIKONTAR Maurice KOR	Maître de Conférences	<i>Vice Doyen / UBda</i>
16	NGOMO Horace MANGA	Maître de Conférences	<i>S. G. MINESUP</i>
17	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste
18	BAIZOUMI ZOUA	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINTOUR</i>
19	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
20	GWET Simon Pierre	Chargé de Cours	En poste
21	KEUMEGNE MBOUGUEM Jean claude	Chargé de Cours	En poste
22	KONG SAKEO	Chargé de Cours	<i>C. M. au P. M.</i>
23	NJIOMOU Chantale épouse DJANGANG	Chargé de Cours	En poste
24	NJOYA Dayirou	Chargé de Cours	En poste
25	SIGNING Pierre	Chargé de Cours	En poste
26	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
27	CHEUMANI YONA Arnauld	Chargé de Cours	En poste
28	KAMGANG YOUBI Georges	Chargé de Cours	En poste
29	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargé de Cours	En poste
30	PABOUDAM GBAMBIE Awoua	Chargé de Cours	En poste
31	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
32	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Assistant	En poste
33	KENNE DEDZO Gustave	Assistant	En poste
34	MBEY Jean Aimé	Assistant	En poste
35	NCHIMI NONO Katia	Assistante	En poste
36	NDI Julius NSAMI	Assistant	En poste
37	NDOSIRI Bridget NDOYE	Assistante	En poste
5- DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (C.O.) (34)			
1	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen/DSSE</i>
2	GHOGOMU TIH Robert Raphaël	Professeur	En poste
3	MBAFOR Joseph	Professeur	En poste
4	NGADJUI TCHALEU Bonaventure	Professeur	<i>Chef de Dépt FMBS</i>
5	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	En poste
6	NKENGFACK Augustin Ephraïm	Professeur	<i>Chef de Département</i>
7	NYASSE Barthélemy	Professeur	<i>Directeur au MINESUP</i>
8	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur au MINESUP</i>

9	WANDJI Jean	Professeur	En poste
10	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	CS Rectorat / UY ₁
11	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	VD / UB
12	KAPNANG Henriette	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	NOUNGOUE TCHAMO Didérot	Maître de Conférences	En poste
16	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	D.A.A.C. UY ₁
17	TIH née NGO BILONG Anastasie	Maître de Conférences	En poste
18	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
19	AMBASSA Pantaleon	Chargé de Cours	En poste
20	EYONG Kenneth OBEN	Chargé de Cours	En poste
21	FOTSO WABO Ghislain	Chargé de Cours	En poste
22	KENMOGNE Marguerite	Chargé de Cours	En poste
23	MBAZOA née DJAMA Céline	Chargé de Cours	En poste
24	MKOUNGA Pierre	Chargé de Cours	En poste
25	NGO MBING Josephine	Chargé de Cours	En poste
26	NGONO BIKOBO Dominique S.	Chargé de Cours	En poste
27	NOTE LOUGBOT Olivier	Chargé de Cours	En poste
28	OUAHOUE WACHE Blandine Marlyse	Chargé de Cours	En poste
29	TABOPDA KUATE Turibio	Chargé de Cours	En poste
30	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
31	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Chargé de Cours	En poste
32	KAMTO Eutrophe Ledoux	Assistant	En poste
33	NGINTEDO Dominique	Assistant	En poste
34	NGOMO Orléans	Assistant	En poste
6-DEPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (28)			
1	TCHUENTE Maurice	Professeur	PCA UB
2	ATSA ETOUNDI Roger	Maître de Conférences	Chef Dépt./CD MINFOPRA
3	FOTSO Pauline Laure	Maître de Conférences	Vice-Recteur UDs
4	FOUDA NDJODO Marcel	Maître de Conférences	IA ₁ MINESUP/ Chef Dpt ENS
5	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
6	CHEDOM FOTSO Donatien	Chargé de Cours	En poste

	KOUOKAM KOUOKAM Etienne A.	Chargé de Cours	En poste
7	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
8	MOTO PONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
10	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
11	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
12	ABESOLO ALO'O Gislain	Assistant	En poste
13	AMINOU Halilou	Assistant	En poste
14	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
15	DJOUWE MEFFEJA Merline	Assistante	En poste
16	EBELE Serge	Assistant	En poste
17	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
18	KAMDEM KENGNE Christiane	Assistante	En poste
19	KAMGUEU Patrick Olivier	Assistant	En poste
20	KENFACK DONGMO Clauvice Viliane	Assistant	En poste
21	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
22	MAKEMBE S. Fritz Oswald	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	MONTHÉ DJIAEU Valéry Martial	Assistant	En poste
26	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
27	TAPAMO Hyppolite	Assistant	En poste
7-DEPARTEMENT DE MATHEMATIQUE (MA) (37)			
1	BEKOLLE David	Professeur	<i>Vice-Recteur UN</i>
2	BITJONG NDOMBOL	Professeur	<i>DPI UYII</i>
3	DOSSA COSSY Marcel	Professeur	En poste
4	NGUETSENG Gabriel	Professeur	<i>Chef du CUTI UYI</i>
5	NOUTCHEGUEME Norbert	Professeur	En poste
6	EMVUDU WONO Yves	Maître de Conférences	<i>Chef de Cellule. MINESUP</i>
7	TCHAPNDA NJABO Sophonie Blaise	Maître de Conférences	En poste
8	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
9	TONGA Marcel	Maître de Conférences	En poste
10	WAMON François	Maître de Conférences	<i>Chef de Département</i>
11	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	En poste
12	AYISSI Raoult Domingo	Chargé de Cours	En poste

13	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
14	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
15	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
16	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
17	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
18	MBIANDA Gilbert	Chargé de Cours	En poste
19	MBELE BEDIMA Martin	Chargé de Cours	En poste
20	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
21	NGUEFACK Bertrand	Chargé de Cours	En poste
22	NGUIMTSA Charles	Chargé de Cours	En poste
23	NOUNDJEU Pierre	Chargé de Cours	En poste
24	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
25	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
26	TIAYA TSAGUE N. Anne- Marie	Chargé de Cours	En poste
27	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
28	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
29	MBEHOU Mohamed	Chargé de Cours	En poste
30	BOGSO Antoine M	Assistant	En poste
31	DJIADEU NGAHA Michel	Assistant	En poste
32	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
33	NIMPA PEFOUNKEU ROMAIN	Assistant	En poste
34	POLA DOUNDOU Emmanuel	Assistant	En poste
35	TAKAM SOH Patrice	Assistant	En poste
36	TANG AHANDA Barnabé	Assistant	<i>Chef Serv. MINPLAMAT</i>
37	TETSADJIO TCHILEPECK Mesmin E.	Assistant	En poste
8- DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MB) (13)			
1	ETOA François-Xavier	Professeur	<i>Chef de Dépt., CT/PM</i>
2	ESSIA NGANG Jean Justin	Maître de Conférences	<i>Chef Div. Recherche IMPM</i>
3	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
4	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
5	BOYOMO ONANA	Chargé de Cours	En poste
6	ENO Anna Arey	Chargé de Cours	En poste
7	ESSONO OBOUGOU Germain Gabriel	Chargé de Cours	En poste
8	NYEGUE Maximilienne Ascencion	Chargé de Cours	En poste

9	RIWOM Sara Honorine	Chargé de Cours	En poste
10	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Chargé de Cours	En poste
11	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOY Jacky	Assistante	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Assistant	En poste
9-DEPARTEMENT DE PHYSIQUE (PH) (40)			
1	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	<i>Vice-Doyen/DRC</i>
2	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
3	NJOMO Damien	Professeur	En poste
4	WOAFO Paul	Professeur	En poste
5	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	En poste
6	BEN-BOLIE Germain Hubert	Maître de Conférences	En poste
7	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef de Dépt. UN</i>
8	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Maître de Conférences	<i>Chef Serv. MINRESI</i>
9	NOUAYOU Robert	Maître de Conférences	En poste
10	OUMAROU BOUBA	Maître de Conférences	<i>Recteur UY II</i>
11	PEMHA Elkana	Maître de Conférences	En poste
13	TABOD Charles TABOD	Maître de Conférences	<i>Doyen UBda</i>
14	TCHAWOUA Clément	Maître de Conférences	En poste
15	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste
16	BIYA MOTTO Frédéric	Chargé de Cours	<i>Dir. Gén.B.MEKIM</i>
17	BODO Bernard	Chargé de Cours	En poste
18	DJUIDJE KENMOE G. épse A. KAZE	Chargé de Cours	En poste
19	EDONGUE Hervais	Chargé de Cours	En poste
20	EYEBE FOU DA Jean-Sire	Chargé de Cours	En poste
21	FEWO Serge Ibraïd	Chargé de Cours	En poste
22	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	En poste
23	HONA Jacques	Chargé de Cours	En poste
24	MBANE BIOUELE	Chargé de Cours	En poste
25	MBONO SAMBA Yves Cliristian	Chargé de Cours	En poste
26	NÀNA NBENDJO Blaise	Chargé de Cours	En poste
26	NDOP Joseph	Chargé de Cours	En poste
27	OBONOU MARCEL	Chargé de Cours	En poste
28	SAIDOU	Chargé de Cours	En poste

29	SIEWE SIEWE Martin	Chargé de Cours	En poste
30	SIMO Elie	Chargé de Cours	En poste
31	TABI Conrad Bertrand	Chargé de Cours	En poste
32	TCHOFFO Fidèle	Chargé de Cours	En poste
33	VONDOU DERBETINI Appolinaire	Chargé de Cours	En poste
34	WAKATA née BEYA Annie	Chargé de Cours	<i>Chef Serv. MINESUP</i>
35	WOULACHE Rosalie Laure	Chargé de Cours	En poste
36	ABDOURAHIMI	Assistant	En poste
37	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
38	ENYENGUE NYAM F. Epse BELINGA	Assistant	En poste
39	MBINACK Clément	Assistant	En poste
40	MBOUSSI NKOMIDIO Aissatou	Assistant	En poste
10- DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (S.T.) (44)			
1	BILONG PAUL	Professeur	<i>Doyen / Chef de Dépt.</i>
2	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
3	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / UN</i>
4	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Maître de Conférences	En poste
5	KAMGANG Pierre	Maître de Conférences	En poste
6	MEDJO EKO Robert	Maître de Conférences	<i>D.I.P.D. UYI</i>
7	MVONDO ONDOA Joseph	Maître de Conférences	En poste
8	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Maître de Conférences	En poste
9	NDJIGUI Paul-Désiré	Maître de Conférences	En poste
10	NGOS III Simon	Maître de Conférences	<i>D.A.A.C / UM</i>
11	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
12	NKOUMBOU Charles	Maître de Conférences	En poste
13	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
14	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. MINFOF</i>
15	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Chargé de Cours	<i>Chef D.A.A.S.R.</i>
16	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
17	BISSO Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Dir.P. Barrage Memve'ele</i>
18	EKOMANE Emile	Chargé de Cours	<i>CS / MINMIDT</i>
19	ESSONO Jean	Chargé de Cours	<i>C.E.A MINIMDT</i>
20	GANNO Sylvestre	Chargé de Cours	En poste
21	GHOGOMU Richard TANWI	Chargé de Cours	En poste

22	LAMILÉN BI,LLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
23	LIENOU Gaston	Chargé de Cours	En poste
24	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
25	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	En poste
26	MOUAFO Lucas	Chargé de Cours	En poste
27	MOUNDI Amidou	Chargé de Cours	<i>Inspecteur 1. MINIMDT</i>
28	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargé de Cours	En poste
29	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargé de Cours	En poste
30	NGUETCHOUA Gabriel	Chargé de Cours	En poste
31	NJOM Bernard de Lattre	Chargé de Cours	En poste
32	NYECK Bruno	Chargé de Cours	<i>S/Directeur/MINMIDT</i>
33	ONANA Vincent	Chargé de Cours	<i>C. S. MINIMDT</i>
34	TCHAKOUNTE J. épouse. NUMBEM	Chargé de Cours	En poste
35	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Chargé de Cours	En poste
36	ZO'O ZAME Philémon	Chargé de Cours	<i>S. G. MINTP</i>
37	ANABA ONANA Achille Basile	Assistant	En poste
38	BINELI BETSI Thierry Olivier	Assistant	En poste
39	FUH Calistus Gentry	Assistant	<i>Sec. d'Etat / MINMIDT</i>
40	METANG Victor	Assistant	En poste
41	NOMO NEGUE Emmanuel	Assistant	En poste
42	TCHAPTCHET TCHATO De Pesquidoux 1	Assistant	En poste
43	TEHNA Nathanaël	Assistant	<i>CS / MINMIDT</i>
44	TENGA Jean Pierre	Assistant	En poste

Répartition chiffrée des Enseignants permanents par Département (10 Février 2015)

Département	Nombre d'Enseignants				
	Pr	MC	CC	ASS	TOTAL
BC	4(0)	7(2)	16(10)	14(6)	41(18)
BPA	9(0)	8(0)	15(7)	13(5)	45(12)
BPV	1(0)	7(0)	11(3)	8(6)	27(9)
C.1.	4(0)	13(2)	14(3)	6(2)	37(7)
C.O.	9(0)	10(2)	12(6)	3(0)	34(8)
IN	1(0)	4(1)	7(0)	16(5)	28(6)
MA	5(0)	6(0)	19(1)	7(1)	37(2)
MB	1(0)	2(0)	7(3)	3(0)	13(3)
PH	6(0)	8(0)	21(3)	5(2)	40(5)
ST	3(0)	11(1)	22(4)	7(0)	44(5)
TOTAL	43(0)	76(8)	144(40)	82(27)	346(75)

Soit un total de

346 (75) dont

Professeurs	43(0)
Maîtres de Conférences	76(8)
Chargés de Cours	144(40)
Assistants	82(27)

() = Nombre de femmes

Le Doyen de la Faculté des Sciences

Pr. BILONG Paul

SOMMAIRE

LIST OF LECTURERS IN THE FACULTY OF SCIENCE	i
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS	i
DEDICACE	xvii
REMERCIEMENTS.....	xix
LISTE DES TABLEAUX.....	xxii
RESUME	xxxii
ABSTRACT.....	xxxii
Hypothèse de travail	4
Objectif général du travail	4
Objectif spécifiques	4
CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTERATURE.....	5
I. 1 L'inflammation: définition et rôle	6
I.1.1 Définition et rôle de l'inflammation	6
I. 1.2 Cellules de l'immunité impliquées dans l'inflammation	6
I.1.3 Phagocytose et les molécules sécrétées par les cellules lors de l'inflammation.....	9
I.1.4 Cytokines impliquées dans l'inflammation et leur rôle	16
I.1.5 Molécules utilisées pour mimer l'inflammation: Les Lipopolysaccharides et l'Interféron γ	19
I. 1.6 Mécanismes impliqués dans la transduction du signal cellulaire	19
I.1.7 Polyphénols comme molécules multifonctionnelles et rôle des Sirtuines.....	21
I.2 Régulation de l'inflammation par les polyphénols, le stress oxydant et la maladie d'Alzheimer	32
I.2.1 L'inflammation.....	32
I.2.2 Le stress oxydant	33
I.2.3 La maladie d'Alzheimer.....	33
I.2.4 Modèles utilisés pour les études concernant la maladie d'Alzheimer	42
I.2.5 Polyphénols et maladies neuroinflammatoires	42
I.2.6 Le Diabète	42

I.2.7 L'asthme.....	43
I.3 La Baicaline	43
I.4 <i>Entada africana</i> (Fabaceae).....	45
I.5 <i>Khaya grandifoliola</i> (Méliaceae).....	46
CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES	47
II- 1. MATERIEL	48
II-1-1. MATERIEL VEGETAL	48
II-1-2. ANIMAUX D'EXPERIENCE ET LIGNEES CELLULAIRES	48
II-1-3. REACTIFS	49
II-2. METHODES.....	49
II-2-1. Préparation des extraits au CH ₂ Cl ₂ /MeOH 1:1 V/V de <i>Khaya grandifoliola</i> et <i>d'Entada africana</i> et obtention des fractions par chromatographie flash	49
II-2-2 Fractionnement de l'extrait brut de <i>K.grandifoliola</i> par chromatographie sur colonne	51
II-2-3. Culture cellulaire	51
II-2-4. Détermination de la viabilité cellulaire: Test au MTT.....	52
II-2-5. Mesure de la production de l'oxyde nitrique (NO).....	52
II-2-6. Production et mesure du H ₂ O ₂ (espèces réactives de l'oxygène) intracellulaire	54
II-2-7 Mesure de l'activité phagocytaire	55
II-2-8 Préparation des ARNms totaux des cellules et mesure de l'expression des cytokines	55
II-2-9. Extraction et Préparation des protéines	60
II-2-10. Séparation des protéines par SDS page.....	63
II-2-11. Inhibition de l'activité de la p38 MAP Kinase et du JNK3 par les composés actifs.....	65
II-2-12 Effet de la Baicaline sur l'amélioration des changements neurologiques dans un modèle de la maladie d'Alzheimer.....	67
II. 3 Analyses statistiques	69
CHAPITRE 3: RESULTATS	69
III. Effet anti-inflammatoire d' <i>Entada africana</i> sur l'activité des macrophages (Raw 264.7) et des microglies (N9)	70
III-1. Effet d' <i>Entada africana</i> sur les macrophages	70
III.1.1 Test de viabilité cellulaire au MTT	70

III. 1-2 Effet des extraits et des fractions d' <i>Entada africana</i> sur la production de NO	73
III-1.3 Effet de la fraction Ea5 sur la production de H ₂ O ₂ intracellulaire	75
III-1.4 Effet de la fraction Ea5 sur l'activité phagocytaire des cellules Raw 264.7	76
III-1.5 Effet de la fraction Ea5 sur l'expression du mRNA des cytokines pro-inflammatoires	77
III-1.6 Effet de la fraction Ea5 sur l'expression du mRNA des cytokines anti-inflammatoires.....	79
III-1.7 Effet de la fraction Ea5 sur l'expression du mRNA de l'inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS).....	80
III-1.9 Discussion partielle	81
III-1.10 Conclusion partielle	84
III-2 Effet d' <i>Entada africana</i> sur les microglies (N9).....	85
III.2-1 Test de viabilité cellulaire au MTT.....	85
III-2-2 Effet des extraits et des fractions d' <i>Entada africana</i> sur la production de NO.....	88
III-2.3 Effet de la fraction Ea5 sur la production de H ₂ O ₂ intracellulaire	90
III.2.4 Effet de la fraction Ea5 sur l'activité phagocytaire des cellules N9.....	91
III-2.5 Effet de la fraction Ea5 sur l'expression du mRNA des cytokines pro-inflammatoires	92
III-2.6 Effet de la fraction Ea5 sur l'expression du mRNA de l'inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS).....	94
III-2.7 Effet de la fraction Ea5 sur l'activité de la p38 MAP Kinase.....	95
III-2.8 Effet de la fraction Ea5 sur l'expression de la protéine p42/44 MAPKs	96
III.2.9 Discussion partielle	97
III.2.10 Conclusion partielle.....	99
III.3 Effet des extraits et sous fractions de <i>Khaya grandifoliola</i> sur la viabilité et la production d'Oxide nitrique par les cellules Raw 264.7et N9	100
III.3.1 Effet sur la viabilité cellulaire.....	102
III.3.2 Effet des fractions de <i>K. grandifoliola</i> sur la production de NO dans les cellules Raw et N9	102
III-3.3 Effet des sous fractions 70 et KF25 de <i>K. grandifoliola</i> sur l'expression de l'iNOS et des cytokines pro-inflammatoires	110
III-3.4 Effet des fractions et sous fraction 70/KF25 sur l'activité de la p38 MAPK Kinase et du JNK3	118
III-3.5 Effets de la fraction 25 sur le JNK3.....	119
III.3.6 Discussion partielle	120
III.3.7 Conclusion partielle.....	122

III-4 Effet de la Baicaline sur les paramètres neuropathologiques et les déficits comportementaux dans un modèle de la maladie d'Alzheimer	123
III-4-1 Test de construction des nids	123
III-4-2 Effet du traitement à la Baicaline sur le dépôt des plaques d'amyloïde et l'activation des microglies.....	125
III-4-3 Discussion partielle	131
IV-5 Conclusion partielle.....	132
CHAPITRE 4: DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES	133
IV-1 DISCUSSION GENERALE	134
IV-2 Conclusion générale	138
IV-3 PERSPECTIVES.....	139
BIBLIOGRAPHIE	140
ANNEXE	168

DEDICACE

Fais de l'Éternel tes délices et il te donnera ce que ton cœur désire.

A la famille Ayissi et en particulier à mon feu Papa Mr AYISSI BELIBI Etienne.

REMERCIEMENTS

Cette thèse a bénéficié de la contribution des personnes auxquelles je voudrais exprimer ma profonde gratitude.

Ainsi, mes remerciements vont:

Au **Pr MOUNDIPA FEWOU Paul**, Chef de Département de Biochimie et Chef du Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie (Département de Biochimie, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé 1, Cameroun) dans lequel ce travail a été effectué. Je voudrais lui exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir accueilli depuis le DEA, d'avoir accepté de diriger ces travaux et d'avoir apporté toute son expertise tout au long de la réalisation de cette thèse.

Au **Pr SCHLUESENER J. Hermann**, Chef d'Unité de la Division d'Immunopathologie du système nerveux (Département des Sciences de la nature, Faculté de Médecine, Université de Tuebingen, Allemagne) à qui je tiens à adresser mes sincères remerciements pour m'avoir accueilli dans son Unité de Recherche, pour sa disponibilité et sa détermination de voir l'aboutissement de cette thèse. Nous le remercions également pour la collaboration initiée entre son unité de recherche et le laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie.

Au **Pr LAUFER Stefan**, Chef de Département de Pharmacologie (Département de Pharmacie, Faculté des sciences, Université de Tuebingen, Allemagne) pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour ses conseils tout au long de ce travail.

Au **Dr NAUMANN Ulrike**, Chef de Laboratoire de Neuro-toxicologie (Département des sciences de la nature, Institut Hertie, Université de Tuebingen, Allemagne) pour m'avoir encadré durant la réalisation d'une partie de ce travail dans son Institut et notamment sur la paillasse.

Au **Dr GUSS Andreas** (Département des Sciences de la Nature, Faculté de médecine, Université de Tuebingen, Allemagne) pour m'avoir encadré durant la réalisation de mes travaux, pour ses conseils et sa disponibilité.

Au **Dr ZHANG Zhiren** pour son encadrement au laboratoire, ses conseils et ses critiques constructives pour la réalisation de ce travail.

A tous les Enseignants du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I pour leur encadrement académique.

Aux membres du laboratoire, **Drs TCHANA Angèle, NJAYOU Nico, AKONO NANTIA Edouard, DONFACK Hubert** et **MANFO Faustin** pour leurs conseils et encouragements dans l'élaboration de cette thèse.

Aux membres de l'équipe de recherche de l'Université de Tuebingen, notamment au **Dr AZADEH Ebrahimi, Dr CHAOYUN LI, ZUG Caroline, LIU Xiao** et **KRAUSSE Franziska** pour leurs conseils et encouragements.

A mes camarades de laboratoire: **NJOYA Emmanuel, GALANI Borris, PECHANGOU Sylvain** pour leurs conseils, leurs suggestions et encouragements dans l'élaboration de ce travail.

A mes amis et camarades: **Dr NONO Justin, NDOZENG Paul, OUM PEE Moise, NGUEFACK Hervé** et **DONFACK NGUIMFACK Blaise** pour leur soutien et leurs encouragements.

A mes frères et sœurs **AYISSI Françoise, AYISSI Anne Loretha, AYISSI Vanel**, et **AYISSI Velga**, qui n'ont ménagé aucun effort pour me soutenir moralement tout au long de ce travail.

INSTITUTIONS ET FINANCEMENT DE LA THESE

Nous tenons également à remercier les institutions dans lesquelles cette thèse a été réalisée.

Nous remercions :

- L'Université de Yaoundé 1 et précisément le Département de Biochimie et le Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie (Cameroun).
- L'Université de Tuebingen et précisément la Division d'Immunopathologie du système nerveux (Département des Sciences de la nature, Faculté de Médecine, Université de Tuebingen, Allemagne).

Pour les organismes, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à :

- **La Deutsche Akademische Austauschdienst (DAAD)** qui a entièrement financé ce travail à travers l'octroi d'une bourse de 2 ans en Allemagne.
- **La Fondation Internationale pour la Science (IFS)** qui a financé la récolte des plantes.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Polyphénols et leurs effets sur l'expression des médiateurs de l'inflammation	23
Tableau 2: Polyphénols et effets sur les voies de signalisation cellulaire.	28
Tableau 3: Polyphénols et doses utilisées dans le traitement des maladies liées à l'inflammation.	30
Tableau 4: Polyphénols et plantes utilisées pour la recherche de nouveaux composés.....	31
Tableau 5: Polyphénols et effets sur les médiateurs de l'inflammation.	32
Tableau 6: Préparation de la solution d'amplification pour RT-PCR.....	57
Tableau 7: Préparation des tubes pour PCR	58
Tableau 8: Amorces utilisées	59
Tableau 9: Préparation de la solution de PCR	60
Tableau 10: Tampon d'extraction des protéines.....	61
Tableau 11. Inhibition de la production de NO induite par le LPS par les fractions d' <i>E. africana</i> et valeurs des IC50 en µg/ml.	75
Tableau 12: IC50 des différentes fractions et de la Baicalin en µg/ml et % d'inhibition du NO à 50 µg/ml.....	90
Tableau 13. Inhibition de l'Oxyde Nitrique et cytotoxicité de l'extrait brut et des fractions de <i>Khaya grandifoliola</i> sur les cellules Raw 264.7 testées à la concentration de 50µg/ml.....	103
Tableau 14. Inhibition de l'Oxyde Nitrique et cytotoxicité de l'extrait brut et des fractions de <i>Khaya grandifoliola</i> sur les cellules N9.....	103
Tableau 15. Inhibition du NO et cytotoxicité des sous fractions de <i>Khaya grandifoliola</i> sur les cellules Raw 264.7. Les sous fractions issues de la chromatographie sur colonne ont été regroupées en fonction de leur profile en CCM. Fraction CH ₂ CL ₂ (sous-fractions 2-49), Fraction CH ₂ CL ₂ /MeOH 5% (sous-fractions 53-75), Fraction CH ₂ CL ₂ /MeOH 10% (sous-fractions 76-89), Fraction CH ₂ CL ₂ /MeOH 25% (sous-fractions 90-121), Fraction MeOH (sous-fractions 134). 104	

Tableau 16. Inhibition de l'Oxide Nitrique et cytotoxicité des sous fractions de <i>Khaya grandifoliola</i> sur les cellules N9. Les sous fractions issus de la chromatographie sur colonne ont été regroupées en fonction de leur profile en CCM. Fraction CH ₂ CL ₂ (sous-fractions 2-49), Fraction CH ₂ CL ₂ /MeOH 5% (sous-fractions 53-75), Fraction CH ₂ CL ₂ /MeOH 10% (sous-fractions 76-89), Fraction CH ₂ CL ₂ /MeOH 25% (sous-fractions 90-121), Fraction MeOH (sous-fractions 134).	106
Tableau 17. Valeurs des IC50 en µg/ml pour les cellules Raw 264.7 pour la production de NO.	109
Tableau 18. Valeurs des IC50 en µg/ml pour les cellules N9.....	109
Tableau 19: Valeurs des IC50 de la fraction 25 de <i>K. grandifoliola</i> et des sous fractions issues de cette fraction, pour l'inhibition de l'activité de la p38 MAPKinase.....	119

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Formation des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique	13
Figure 2: Effets des espèces réactives de l'oxygène sur les cellules de l'organisme	14
Figure 3: Différentes voies et étapes de formation des espèces réactives de l'oxygène.....	15
Figure 4: Activation de la voie de signal NFκB suite à une fixation des LPS sur leur récepteur sur la membrane cellulaire.....	20
Figure 5: Représentation de cerveau normal (à gauche) et cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer (à droite).....	35
Figure 6: Structure de la Baicaline.....	43
Figure 7: Photographie d' <i>Entada africana</i> (Fabaceae).....	45
Figure 8: Aperçu du tronc d'arbre de <i>Khaya grandifoliola</i> (Meliaceae)	46
Figure 9: Schéma d'extraction et préparation des fractions et sous fractions de <i>K. grandifoliola</i> et d' <i>E. africana</i>	49
Figure 10: Montage de la chromatographie flash	50
Figure 11: Principe du dosage de l'oxyde nitrique	53
Tableau 10: Tampon d'extraction des protéines.....	61
Figure 12: Montage du dosage par Elisa.....	66
Figure 13. Représentation schématique mettant en évidence le cerveau de souris	68
Figure 14. Effet de la baicaline, des extraits bruts et des fractions d' <i>E. africana</i> sur la viabilité des macrophages traités au LPS.	71
Figure. 15. Effet d' <i>Entada africana</i> sur la viabilité des cellules Raw 264.7 (A) induites ou non par les LPS (1µg/ml) pendant 24 et 48h.	72
Figure 16. Inhibition de la production de NO induite par les LPS en présence de l'extrait brut, de la Baicaline et des fractions d' <i>E. africana</i>	74
Figure 17. Effet de la fraction CH ₂ Cl ₂ / MeOH 5% d' <i>E. africana</i> sur la production de H ₂ O ₂ par les cellules Raw 264.7 traitées par les LPS (5x10 ⁵ cell/ml).	76

Figure 18. Effet de la fraction Ea5 sur l'activité phagocytaire des cellules Raw 264.7 à la suite d'une exposition aux LPS.	77
Figure 19. Effet de la fraction au CH ₂ Cl ₂ / MeOH 5% d' <i>E. africana</i> sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires sur les macrophages traités par les LPS.	78
Figure 20. Effet de la fraction Ea5 sur l'expression des cytokines anti-inflammatoires par les macrophages.	79
Figure 21. Effet d'Ea5 et de la baicaline sur l'expression de l'iNOS par les macrophages	80
Figure 22. Effet d'Ea5 et de la baicaline sur l'inhibition de l'activité de la p38 MAPK Kinase.	81
Figure 23. Effets de la baicaline, de l'extrait brut et des fractions d' <i>E. africana</i> sur la viabilité des cellules N9.	86
Figure. 24. Effet d' <i>Entada africana</i> sur la viabilité des cellules N9 induites ou non par les LPS (1µg/ml) pendant 24 et 48h.....	87
Figure 25. Inhibition de la production de NO induite par les LPS par l'extrait brut et les fractions d' <i>E. africana</i>	89
Figure 26. Effet de la fraction CH ₂ Cl ₂ / MeOH 5% d' <i>E. africana</i> sur la production de ROS par les cellules N9 traitées par les LPS	91
Figure 27. Effet d'Ea5 sur l'activité phagocytaire des cellules N9 à la suite d'une exposition aux LPS.....	92
Figure 28. Effet de la fraction au CH ₂ Cl ₂ / MeOH 5% d' <i>E. africana</i> (Ea5) sur l'expression des cytokines proinflammatoires sur les cellules N9 induites par les LPS.	93
Figure 29. <i>E. africana</i> et la baicalin réduisent l'expression du gène de l' iNOS induit par le traitement des cellules avec les LPS.	94
Figure 30. Effet d' <i>E. africana</i> et de la baicaline sur l'inhibition de l'activité de la p38 MAPK..	95
Figure 31: Détection de la p42/44 MAPK dans les microglies traitées par Ea5 et la baicaline. ..	96
Figure 32: Fractionnement de <i>Khaya grandifoliola</i> et obtention de différentes sous fractions. L'extrait brut de <i>K.grandifoliola</i> a été fractionné, puis les différentes fractions ont été par la suite soumises à une chromatographie sur colone pour l'obtention des différentes sous fractions. ...	101

Figure.33. Effet de l'extrait brut de <i>K. grandifoliola</i> et des différentes fractions sur la viabilité des macrophages et des microglies induits par les LPS.	102
Figure 34. Effet des sous fractions 78, 64-67, 70 et de la fraction 25 et sous fractions 90-102 et 78 de <i>K. grandifoliola</i> sur la production de NO.	108
Figure. 35. La sous fraction 70 de <i>K. grandifoliola</i> réduit l'expression du gène de l'iNOS induite par les LPS dans les cellules N9.	110
Figure. 36. La fraction 25 de <i>K. grandifoliola</i> réduit l'expression du gène de l'iNOS induite par les LPS dans les cellules N9.	111
Figure 37. Effet de la sous fraction 70 de <i>K. grandifoliola</i> sur l'expression des mRNA de l'IL1 β , TNF α , et IL6 dans les microglies.....	113
Figure 38. Effet de la fraction 25 de <i>K. grandifoliola</i> sur l'expression des mRNA de l'IL1 β , TNF α , et IL6 dans les microglies.	114
Figure. 39. La fraction 25 de <i>K. grandifoliola</i> réduit l'expression du gène de l'iNOS induite par les LPS dans les cellules Raw.....	115
Figure 40. Effet de la fraction 25 de <i>K. grandifoliola</i> sur l'expression des mRNA du TNF α et de l'IL6 dans les microglies.....	117
Figure 41. Effet de la sous fraction 70 de <i>K. grandifoliola</i> et de la baicaline sur l'inhibition de l'activité de la p38 MAPK Kinase.	118
Figure 42: Inhibition de l'activité du JNK3 par la fraction KGF25. Les inhibiteurs compétissent avec l'ATP pour la fixation dans la même poche au site actif du JNK.	119
(Owona, 2012)	124
Figure 43: Test de construction des nids.....	124
Figure 44: Test de construction des nids par les souris transgéniques traitées ou non à la baicaline.	125
Figure 45: Coupes histologiques montrant l'accumulation des plaques d'amyloïde β dans le Cortex et l'hippocampe des souris non traitées et traitées a la baicaline.....	126
.....	127
Figure 46: Nombre de plaques d'amyloïde β dans le cortex (A) et l'hippocampe (B).....	127

Figure 47: Coupes histologiques montrant l'accumulation des plaques de cellules Iba+ dans le cortex, et l'hippocampe des souris traitées à la baicaline.	129
Figure 48: Nombre de cellules Iba+ dans le cortex et l'hippocampe.	130

LISTE DES ABBREVIATIONS

AD : *Alzheimer's Disease*

AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens

APP: *Amyloid Protein Precursor* /Protéine précurseur d'amyloïde

BCA: *Bicinchonic acid* / Acide Bicinchonique

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

COX-2 : Cyclooxygénase 2

DCF: *2'-7'-dichlorofluorescein* / *2'-7'-dichlorofluorocéine*

DMH: Diméthylhydrazine

DMSO: DiMéthyl SulfOxide

DSS: *Dextran sodium sulfate*

Ea5: *Entada africana* fraction CH₂CL₂/MeOH 5%

EGb 761 : Extrait de Ginkgo biloba 761

EAC : Equivalent d'Acide Chlorogénique

EGCG: EpiGaloCathéchine Gallate

FAD : *Flavin-Adenine-Dinucleotide*

FOXO : Forkhead box O

GCs: Guanylate Cyclase soluble

H2DCF: *2'-7'-dichlorofluorescein*

H4BPT: Tétrahydrobioptérine

HDAC: *Histone deacetylase*

IC50 : *Inhibitory concentration 50*

IFN- γ : Interféron-gamma

IL1 β : Interleukine 1 β

IL6: Interleukine

iNOS : *Inducible Nitric Oxide Synthase*

JNK: *c-Jun N-terminal kinases*

KGF: Fractions de *Khaya grandifoliola*

KGSF: Sous fractions de *Khaya grandifoliola*

KG25: *Khaya grandifoliola* fraction 25%

LAF: *Leucocyte activating factor*

L-NMMA: *N (G)-monomethyl-L-arginine*

LOX: *5-lipoxygenase*

LPS: Lipopolysacharides

MAPK: *Mitogen activated protein kinase*

MMLV-RT: Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase:

MTT: 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide

NED: Naphthyléthylène diamine dihydrochloride

NF- κ B: *Nuclear factor-kappa B*

NK: *Natural killer*

NO: *Nitric Oxide*

PPR: *Pattern recognition receptor*

RCPG : Récepteurs membranaires à 7 segments transmembranaires couplés à des protéines G

RNA : *Ribonucleic Acid*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

SDS-PAGE: Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium

SNC : Système nerveux central

SOD: Superoxyde dismutase

tBOOH: *Tertiary butyl hydroperoxide*

TLR: *Toll-like receptor*

TNF α : *Tumor necrosis factor alpha*

Tregs: Cellules T régulatrices

RESUME

Khaya grandifoliola (Méliaceae) et *Entada africana* (Fabaceae) sont des plantes médicinales utilisées dans l'Ouest du Cameroun pour le traitement de plusieurs maladies parmi lesquelles le paludisme, et les maladies du foie. Les études antérieures ont montré que les extraits bruts de ces plantes stimulent les activités phagocytaires et chimiotactiques des macrophages péritonéaux de rats. Dans le souci de poursuivre la valorisation de ces plantes, leurs activités immunomodulatoires et anti-inflammatoires ont été évaluées *in vitro* en utilisant les macrophages et les microglies. En plus, la baicaline, un flavonoïde dont les activités anti-inflammatoires ont été démontrées *in vitro*, a été évaluée *in vivo* pour ses effets sur la maladie d'Alzheimer utilisant des souris transgéniques APP/PS1. L'extrait brut d'*Entada africana* ayant présenté une activité inhibitrice de la production du NO, il a été ensuite fractionné pour donner 5 fractions. La fraction CH₂Cl₂/MeOH 5% (Ea5) a démontré l'activité inhibitrice la plus élevée contre la production de NO induite par les LPS [IC₅₀ = 18.36 µg/ml], (89.068%), par comparaison avec les autres fractions et la baicaline (63.34%). En plus, nous avons constaté que Ea5, aussi bien que la baicaline inhibent significativement l'expression du mRNA du TNFα, de l'IL6 et de l'IL1β induite par les LPS (P<0.05). Ea5 a aussi atténué l'expression du mRNA de l'iNOS, ceci de manière dose-dépendante (P<0.05). L'expression des cytokines anti-inflammatoires (IL10 et IL13) a été significativement stimulée par Ea5 (P<0.05). La fraction 25% de *K. grandifoliola* (KG25) a significativement inhibé l'expression des mRNAs des cytokines pro-inflammatoires (IL1β, TNFα et IL6) dans les macrophages et les microglies. Ces résultats montrent que KG25 inhibe les activités du p38MAPK Kinase (90% pour KG25 et 89% pour la baicaline) et du JNK 3 (60% pour KG25 et 34% pour la baicaline). Le traitement des souris transgéniques APP/PS1 avec la baicaline a montré que cette substance inhibe l'accumulation des plaques d'amyloïde β et l'hyperactivation des microglies dans le cerveau de ces souris. Ce travail montre que les fractions Ea5, KG25 ayant présenté des activités meilleures que la baicaline, contiendraient des composés prometteurs dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Mots clés. *Khaya grandifoliola*, *Entada africana*, Baicaline, macrophages Raw, microglies N9, cytokines

ABSTRACT

Khaya grandifoliola (Meliaceae) and *Entada africana* (Fabaceae) are medicinal plants used in Western part of Cameroon for the treatment of many diseases including malaria and liver related diseases. Previous studies showed that their crude extracts improved the phagocytic and chemotactic activities of rat peritoneal macrophages. In order to continue the valorization of these plants, their immunomodulatory and anti-inflammatory activities were evaluated *in vitro* on Raw 264.7 and N9 cells. Moreover, the effect of baicalin, a flavonoid whose activities have been demonstrated via its anti-inflammatory effect, was studied for its effect on the treatment of Alzheimer disease using APP/PS1 transgenic mice. The anti-inflammatory activity of *Entada africana* was evaluated via *in vitro* inhibitory activities against lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production. Since the crude extract showed inhibitory activity on NO production, it was further fractionated into 5 different fractions. The CH₂Cl₂/MeOH 5% (Ea5) fraction demonstrated the highest inhibition of LPS-induced NO production with an IC (50) of 18.36µg/ml. This fraction showed the highest inhibition of NO (89.068%), in comparison to the other fractions and baicalin (63.34%). We found that Ea5, as well as baicalin significantly inhibited the expression of TNFα, IL-6 and IL-1β mRNA induced by LPS (P<0.05). Ea5 also attenuated mRNA expression of inducible NO synthase, in a concentration-dependent manner (P<0.05). The expression of anti-inflammatory cytokines (IL10 and IL13) was significantly stimulated by Ea5 (P<0.05). In addition, *K. grandifoliola* fraction 25% (KG25) significantly inhibited the mRNA expression of proinflammatory cytokines (IL1β, TNFα and IL6) in microglia and macrophages active cells. Our study demonstrates that KG25 inhibits the p38MAPK Kinase (90% for KG25 and 89% for baicalin) and JNK3 enzymes (60% for KG25 and 34% for baicalin). The treatment of APP/PS1 mice with baicalin significantly attenuated the activation of microglia cells and the deposition of amyloid plaques in the brain of these mice. This work shows that Ea5 and KG25 present better activities in comparison to baicalin and may therefore contain potential compounds for the treatment of Alzheimer disease.

Key-words: *Khaya grandifoliola*, *Entada africana*, Baicalin, Raw macrophages, N9 microglia, cytokines.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'inflammation est un mécanisme crucial de défense de l'organisme contre les agents pathogènes et les attaques des tissus; cependant, une inflammation chronique pourrait contribuer au développement de plusieurs maladies telles que l'athérosclérose et les maladies neurodégénératives (Cui *et al.*, 1993) (Olsen *et al.*, 1996). L'inflammation chronique est un processus complexe impliquant un réseau de cytokines responsables de l'expression de plusieurs gènes pro-inflammatoires (Breton *et al.*, 2011) (Khajuria *et al.*, 2012). La découverte des composés anti-inflammatoires à partir des plantes médicinales et la compréhension de leur mode d'action pourraient contribuer au développement de nouvelles stratégies de lutte contre l'inflammation chronique et les maladies causées par elle (Bermejo *et al.*, 2004).

Les monocytes, les macrophages et les lymphocytes sont les types majeurs de cellules à médiation de l'immunité innée et spécifique (Kamio *et al.*, 2010). Les macrophages sont les médiateurs clé de l'immunité innée et au cours de leur activité phagocytaire en réponse aux infections microbiennes et aux antigènes, ils produisent et libèrent plusieurs médiateurs de l'inflammation afin de pouvoir éliminer l'antigène (Ahrens *et al.*, 2001) (Chen *et al.*, 2002). Les composants de la barrière cellulaire des bactéries sont décrits comme étant les principaux agents antigéniques des microorganismes et leur reconnaissance par les « Toll-like receptors » (TLR) initie une série de réponses cellulaires en réponse aux infections par les bactéries (Julian *et al.*, 2007). Le lipopolysaccharide (LPS) est le constituant majeur de la membrane cellulaire des bactéries gram négatif et est reconnu par les récepteurs cellulaires. En effet, sa fixation au TLR4 déclenche une multitude de signaux cellulaires à l'intérieur de la cellule. Suite à une stimulation au cours d'une infection par des bactéries, des champignons ou des virus, les macrophages produisent différents types de cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF α , l'IL1 β , l'IL6 et des molécules cytotoxiques et inflammatoires tels que l'oxyde nitrique (NO) (Bouvier *et al.*, 1999) et les espèces réactives de l'oxygène (H₂O₂) (Aam et Fonnum, 2007), à travers l'activation des « pattern recognition receptor » (PPR) (Myhre *et al.*, 2003). Les microglies ou encore macrophages du cerveau, partagent plusieurs similitudes morphologiques avec les macrophages et contribuent au processus inflammatoire dans cet organe. Au niveau cellulaire, comme les macrophages, leur activation entraîne une libération des médiateurs de l'inflammation et une activation de la production des cytokines pro-inflammatoires.

Le facteur nucléaire NF- κ B est considéré comme un facteur transcriptionnel primordial pour la régulation de plusieurs gènes impliqués dans les réponses immunitaire et inflammatoire (Weng *et al.*, 2009). Le NF- κ B est un complexe hétérotrimérique composé de p50, p65, et I κ B- α , et son activation est l'évènement clé pour la transcription de plusieurs gènes proinflammatoires qui finalement entraînent le développement de plusieurs pathologies telles que le cancer et les maladies neurodégénératives. Le NF- κ B joue un rôle clé dans la production de plusieurs médiateurs proinflammatoires tels que l'oxyde nitrique synthase (iNOS), la cyclooxygénase 2 (COX-2), le « tumor necrosis factor alpha » (TNF- α) et l'interleukine (IL)-1 (English *et al.*, 1999). L'oxyde nitrique (NO) est synthétisé par la désamination oxydative de la L-arginine par l'iNOS. Le NO est considéré comme un médiateur important des cancers et la production de NO par l'iNOS associée à la tumeur pourrait favoriser la progression des cancers (Peterhans *et al.*, 1994).

Parmi les maladies caractérisées par une inflammation accentuée, la maladie d'Alzheimer est l'une des plus étudiées (Louzada *et al.*, 2011). Elle est caractérisée par un dépôt des plaques d'amyloïde β dans le cerveau. Les plaques d'amyloïde sont principalement constituées de deux protéines à savoir l'amyloïde β 40 et l'amyloïde β 42 (Godoy *et al.*, 2012). Ces protéines sont produites à partir d'une protéine précurseur d'amyloïde (APP) par deux protéases, la β et la γ sécrétases. La maladie d'Alzheimer est caractérisée par un dépôt progressif des plaques d'amyloïde β et une hyperactivation des microglies entraînant généralement la mort des patients (Zimin *et al.*, 2011). Dans la plus-part des pays en voie de développement, le taux d'incidence de la maladie d'Alzheimer n'a pas encore été rapporté. Au Cameroun, cette maladie reste inconnue de la population. A notre connaissance, aucune donnée n'est disponible sur la prévalence de cette maladie au Cameroun ; qui pourtant dans les prochaines décennies, sera certainement un problème de santé publique.

La recherche de molécules et mélanges de composés pour le traitement de l'inflammation est devenue de nos jours un centre d'intérêt majeur. Plusieurs composés phénoliques à l'instar de la Baicaline sont isolés des plantes médicinales et présentent des effets positifs dans l'atténuation de l'inflammation au niveau cellulaire et moléculaire. Parmi les plantes sources de composés prometteurs, *Khaya grandifoliola* et *Entada africana* sont utilisées en médecine traditionnelle au Cameroun et en Afrique de l'Ouest pour le traitement de plusieurs maladies. Plusieurs composés biologiquement actifs ont été identifiés à partir des racines et des écorces de ces plantes comme les limonoïdes, les alcaloïdes et les flavonoïdes (Oladeinde *et al.*, 2008) (Odeku *et al.*, 2008).

Actuellement, les effets anti-inflammatoires et immunomodulateurs des composés issus de ces plantes n'ont pas été étudiés. La découverte et l'isolement de nouveaux composés à partir de ces plantes seraient d'un apport considérable pour la découverte de nouvelles molécules contre l'inflammation et les maladies liées à l'inflammation.

Hypothèse de travail

Les études préliminaires réalisées avec les extraits bruts de *Khaya grandifoliola* et *Entada africana* ont montré que ces plantes modulent les fonctions phagocytaires et chimiotactiques des macrophages péritonéaux de rats stimulés (Owona *et al.*, 2013). Cependant, malgré ces tests préliminaires, ces plantes pourraient ne pas posséder des propriétés anti-inflammatoires et immunomodulateurs sur les cellules Raw 264.7 et N9.

Objectif général du travail

Cette thèse vise à déterminer les activités immunomodulateurs et anti-inflammatoires des fractions de *Khaya grandifoliola*, *Entada africana* et de la baicaline sur les cellules immunitaires et à identifier des composés potentiels dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Objectif spécifiques

Pour parvenir à cet objectif, les objectifs spécifiques suivants ont été définis :

Déterminer l'effet d'*Entada africana* sur l'expression des cytokines proinflammatoires et des médiateurs de l'inflammation par les macrophages Raw 264.7 et les microglies N9.

Déterminer l'effet anti-inflammatoire des fractions et sous-fractions de *Khaya grandifoliola* par les macrophages Raw 264.7 et les microglies N9 *in vitro*.

Déterminer l'effet de la baicaline sur un modèle de souris transgéniques de la maladie d'Alzheimer.

CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTERATURE

I. 1 L'inflammation: définition et rôle

I.1.1 Définition et rôle de l'inflammation

L'inflammation est une réponse biologique complexe de l'organisme face aux agents extérieurs pathogènes tel que les bactéries et les virus (Shin *et al.*, 2012). La réponse immunitaire confère une protection aux cellules et tissus de l'organisme lorsque les antigènes étrangers y sont introduits (Ichiryu et Fairchild, 2013). Les signes cliniques d'une inflammation sont la douleur, la rougeur, la montée de la température corporelle. L'inflammation est une tentative de l'organisme à se protéger contre les attaques externes, à exclure les agents pathogènes et à initier le processus de guérison. Bien que l'inflammation soit causée par un microorganisme, elle est l'une des réponses de l'organisme contre l'agent pathogène. L'inflammation est considérée comme un mécanisme de défense inné, en comparaison à l'immunité spécifique, médiée par des anticorps spécifiques de chaque agent pathogène.

I. 1.2 Cellules de l'immunité impliquées dans l'inflammation

Plusieurs cellules sont impliquées dans le déroulement de l'inflammation. Ces cellules contribuent à l'élimination de l'agent pathogène par phagocytose et en produisant plusieurs autres molécules et médiateurs impliqués dans le processus d'élimination du pathogène.

✚ Les macrophages

Les macrophages sont des cellules du système immunitaire d'origine sanguine et qui proviennent de la transformation des monocytes. Les macrophages sont localisés dans les tissus pouvant être soumis à des infections ou à une accumulation de débris à éliminer (foie, poumons, ganglions lymphatiques, rate) (Deng *et al.*, 2012). Les macrophages infiltrent le tissu adipeux et induisent une inflammation chronique en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL6, le TNF alpha et l'IL1 qui contribuent à l'accentuer l'inflammation (Jungbauer et Medjakovic, 2012).

Fonction des macrophages

Les macrophages possèdent trois fonctions principales :

phagocytose (ingestion de bactéries, levures, débris cellulaires). La vésicule intracellulaire formée appelée phagosome, sera dirigée vers le lysosome pour sa dégradation complète.

activité de sécrétion (cytokines).

coopération cellulaire (c'est une cellule présentatrice d'antigène, et intervient dans la coopération avec les lymphocytes).

Les macrophages sont trouvés dans plusieurs organes et dans différents tissus dans lesquels ils jouent des fonctions différentes (Rull *et al.*, 2013). Les macrophages sont souvent désignés par des noms spécifiques en fonction de leur localisation, par exemple, dans le foie, ils sont appelés cellules kuppler, et dans le cerveau, ils sont appelés microglies.

Les Neutrophiles

Les neutrophiles sont des globules blancs caractérisés par un noyau présentant plusieurs lobes, 3 le plus souvent, et par de fines granulations du cytoplasme possédant une affinité marquée pour les colorants neutres (Speisky *et al.*, 2009). Les polynucléaires neutrophiles naissent dans la moelle osseuse à partir de cellules peu différenciées, les myéloblastes, qui se spécialisent au fur et à mesure de leur division. Leur rôle essentiel est la défense de l'organisme contre les micro-organismes étrangers, bactéries et levures (Masuda *et al.*, 2012). Les neutrophiles représentent la première ligne de défense cellulaire dans la protection de l'organisme contre l'infection et jouent un rôle irremplaçable dans la réponse immunitaire (Denev *et al.*, 2012). Les polynucléaires neutrophiles gagnent les tissus par diapédèse, c'est-à-dire en passant entre les cellules endothéliales des vaisseaux capillaires. Ils peuvent assurer leur fonction de défense grâce, principalement, à leur mobilité, à leur chimiotactisme (ils sont attirés par certaines substances d'origine bactérienne et certaines fractions du complément, système enzymatique participant à la destruction des antigènes) (Sandrasaigaran *et al.*, 2011), à leur capacité d'ingérer des particules étrangères (phagocytose) (Narciso *et al.*, 2010) et à leur pouvoir bactéricide (Kaplon-Cieslicka *et al.*, 2012), dû à la libération par leurs granulations de substances antibactériennes. Les bactéries tuées sont ensuite digérées par les enzymes protéolytiques. Ces phénomènes se produisent dans les vacuoles de phagocytose, sacs internes qui mettent les polynucléaires à l'abri d'une autodestruction.

Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules du système immunitaire qui font partie du système réticulohistiocytaire (**Cruz et al., 2010**). Elles sont des cellules présentatrices d'antigènes (**Domingo et al., 2009**) et présentent dans certaines conditions, comme leur nom l'indique, des dendrites (des prolongements cytoplasmiques). Les cellules dendritiques ont deux fonctions principales :

le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative, dont les acteurs principaux sont les lymphocytes T et les lymphocytes B, dirigés contre des antigènes du « non-soi »
le maintien de la tolérance centrale au « soi » dans le thymus, par un processus impliquant les lymphocytes T dit de sélection négative.

Elles résident dans les tissus à l'état immature (**Domingo et al., 2009**) et ont une morphologie très variée. On peut citer parmi elles les cellules de Langerhans.

Les microglies

Les microglies (ou microgliocytes) sont une population de cellules gliales constituée de macrophages résidents du cerveau et de la moelle épinière formant ainsi la principale défense immunitaire active du système nerveux central (**Holmquist et al., 2008**). Elles représentent 5 à 25 % de toutes les cellules du système nerveux central (SNC). L'activation des microglies est très souvent observée dans des maladies telles que les maladies d'Alzheimer (**Puig et al., 2013**), et de Parkinson (**Shi et al., 2010**) (**Ou et al., 2010**). Elles sont différentes des cellules macrogliales, que ce soit en ce qui a trait à leur morphologie, leur fonction ou leur origine. Ces petites cellules, généralement de forme étoilée, sont mobiles. Elles appartiennent au groupe des macrophages, et sont des cellules capables de phagocytose. Les cellules microgliales peuvent proliférer lorsque des lésions surviennent dans le SNC. Elles deviennent alors des cellules présentatrices d'antigènes. Quand elles sont actives, elles expriment à leur surface les CMH I et CMH II. Elles secrètent en outre des cytokines, des protéines et des radicaux libres (ex: anions superoxyde) qui peuvent aggraver les lésions.

I.1.3 Phagocytose et les molécules sécrétées par les cellules lors de l'inflammation

I.1.3.1 La phagocytose

La phagocytose est un mécanisme qui permet à certaines cellules spécialisées (macrophages, granulocytes neutrophiles) ainsi qu'à certains organismes unicellulaires l'ingestion de particules étrangères telles que des bactéries, des débris cellulaires, des poussières (Rull *et al.*, 2013). La phagocytose a un rôle important dans la fonction immunitaire, c'est en effet un moyen de défense de l'organisme, notamment lors d'infections bactérienne et parasitaire (Kawaii et Lansky, 2004). L'exposition des macrophages aux radicaux libres comme le "tertiary butyl hydroperoxide (tBOOH)" induit dans ces cellules un stress oxydatif et altère leurs fonctions phagocytaires (Athar *et al.*, 2008).

I.1.3.2 L'oxyde nitrique synthase (iNOS)

L'oxyde nitrique synthase (iNOS) est une protéine enzymatique qui synthétise l'oxyde nitrique, un radical libre présent dans la circulation sanguine (Taintor *et al.*, 1988). C'est une simple chaîne polypeptidique qui possède plusieurs domaines s'enroulant autour de deux molécules d'hème (Brune *et al.*, 2000). Cette chaîne polypeptidique possède deux domaines catalytiques, un domaine N-terminal oxygénase et un domaine C-terminal réductase. Le domaine oxygénase lie l'Arginine, l'hème et un cofacteur la tétrahydrobioptérine (H4BPT) (Custot *et al.*, 1994). La tétrahydrobioptérine est requise pour l'induction de la production de NO par les cytokines dans les macrophages Raw 264.7 (Belser *et al.*, 2013) (Kaufman *et al.*, 1993). Le domaine réductase possède un site de liaison pour les flavines (FAD, FMN) et pour le NADPH (Yoon *et al.*, 1988). Ces deux domaines sont connectés par le domaine de la flavine, qui permet le transfert des électrons du NADPH au fer de l'hème. Le cofacteur H4BPT favorise la forme homodimérique de l'iNOS, ce qui lui permet d'être active (Tayeh et Marletta, 1989).

L'iNOS catalyse l'oxydation de l'arginine en oxyde nitrique et en citrulline au niveau du domaine oxygénase de la protéine. L'oxyde nitrique qui est synthétisé par les formes constitutives endothéliales et neuronales est utilisé pendant une courte période (secondes à minutes) (Hevel et Marletta, 1993). Ces formes produisent l'oxyde nitrique pendant un temps très court mais de façon permanente. L'oxyde nitrique produit par la forme inductible est exprimé seulement après

une activation cellulaire ([Hotchkiss et al., 1991](#)). Elle entraîne (la forme inductible) la production d'oxyde nitrique pendant un temps prolongé. L'oxyde nitrique produit par cette protéine active la guanylate cyclase soluble (GCs), entraînant une augmentation de la concentration du GMP cyclique dans les cellules cibles. Le GMPc va lier et activer spécifiquement une protéine kinase, ce qui activera la cellule et ainsi permettra la signalisation cellulaire ([Bromberg et Pick, 1980](#)).

I.1.3.3 L'oxyde nitrique (NO)

L'oxyde nitrique (NO) est un important messenger biologique jouant un rôle déterminant dans une variété de processus biologiques. Le NO est biosynthétisé à partir de la L-arginine, de l'oxygène et du NADPH par plusieurs enzymes « nitric oxide synthase » (iNOS). L'endothélium des vaisseaux sanguins utilise le NO pour permettre la relaxation des muscles environnants, facilitant ainsi la vasodilatation et l'accroissement de la circulation sanguine. Le NO contribue à l'homéostasie des vaisseaux en inhibant la contraction du muscle lisse et sa croissance, l'agrégation des plaquettes, et l'adhésion des leucocytes à l'endothélium. Les humains souffrant d'athérosclérose, de diabète, ou d'hypertension présentent souvent une défaillance de la voie de signalisation du NO. Le NO est également généré par les phagocytes (monocytes, macrophages et neutrophiles) contribuant ainsi à la réponse immunitaire. Les phagocytes sont armés de l'« inducible nitric oxide synthase » (iNOS), qui est activé par l'interféron-gamma (IFN- γ) ou par le « tumor necrosis factor » (TNF). Il a été démontré que le NO active le NF κ B des cellules mononucléaires, celui-ci étant un important facteur de transcription dans l'expression du gène de l'iNOS en réponse à l'inflammation ([Lu et al., 2001](#); [Lu et al., 2001](#)). L'inflammation est caractérisée par une augmentation de la production de NO ([Sarkar et al., 2013](#)). L'oxyde nitrique et ses produits dérivés sont toxiques pour les bacilles ([Das et al., 2013](#)). L'oxyde nitrique fournit d'autres effets vasculaires y compris des effets anti-thrombotiques (il inhibe l'adhésion des plaquettes sanguines à l'endothélium), des effets anti-inflammatoires (il inhibe l'adhérence des leucocytes à l'endothélium) ([Schleicher et al., 2013](#)) et des effets antiprolifératifs (il inhibe l'hyperplasie des muscles lisses) ([Lu et al., 2001](#)). Des données récentes indiquent que l'oxyde nitrique régule également le métabolisme du glucose et l'oxydation des acides gras dans le muscle cardiaque, squelettique et dans le tissu adipeux.

Le NO présente deux avantages majeurs: Il exerce d'abord une action vasodilatatrice remarquable (augmentation du diamètre des vaisseaux sanguins) permettant une irrigation sanguine optimale

des fibres musculaires qui mène à la congestion (Pechanova *et al.*, 2002). Il agit ensuite en tant qu'agent de signalisation cellulaire, en donnant l'ordre d'activer la synthèse protéique. Par ailleurs, l'élévation de la production d'oxyde nitrique entraîne une élévation de la pression sanguine à l'intérieur des muscles et provoque une friction des fibres musculaires les unes contre les autres. Cette friction serait à l'origine du signal porté en direction des myoblastes pour déclencher la synthèse de nouvelles fibres et provoquer l'hyperplasie. De nombreuses cellules sont capable de produire l'oxyde nitrique suite à leur activation par des stimulants externes, parmi lesquels les macrophages et les microglies (Andriambeloson *et al.*, 2002). Les polyphénols contenus dans le vin rouge améliorent la fonction vasculaire à travers des mécanismes médiés par l'oxyde nitrique (Lagrué-Lak-Hal *et al.*, 2009). Des études récentes indiquent que le thé inhibe les effets toxiques causés par une hyperproduction de NO (Yan *et al.*, 2007).

I. 1.3.4 Le COX-2

La Cyclooxygénase-2 est une enzyme qui agit à accélérer la production de certains messagers chimiques, appelés prostaglandines, qui jouent un rôle clé dans la promotion de l'inflammation (Chaabane *et al.*, 2011). L'infection des macrophages par les virus entraîne une stimulation de l'activité de la COX-2 (Moran *et al.*, 2010). Lorsque l'activité de la COX-2 est bloquée, l'inflammation est réduite (Luceri *et al.*, 2009). Les inhibiteurs de COX-2 sont les médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdes (NSAIDs) qui inhibent de façon sélective la cyclooxygénase-2 (Lee *et al.*, 2013). Les cyclooxygénases sont requis pour la formation des prostaglandines (Van De Walle *et al.*, 2009). Ces dernières agissent comme des hormones en contrôlant plusieurs fonctions de l'organisme, comme le contrôle de la pression sanguine et du muscle lisse. Les NSAIDs inhibent à la fois les cyclo-oxygénases 1 et 2 (COX-1 et COX-2). Cependant, tandis que le COX-2 est associé à l'inflammation et à la douleur, le COX-1 maintient l'intégrité de la muqueuse gastrique, médie le fonctionnement des plaquettes et régule la circulation du sang dans les reins.

Le développement des inhibiteurs sélectifs du COX-2 permet actuellement de découvrir de nouveaux médicaments contre les douleurs et les maladies anti-inflammatoires tout comme les NSAIDs sans causer les ulcères gastriques qui ont été observés avec les médicaments antérieurs (Akhtar *et al.*, 2009). L'action des cyclo-oxygénases (COX-1 et COX-2) sur les acides gras AA produit des intermédiaires qui après l'action des prostaglandines synthases deviennent des

prostaglandines. Il est admis que la COX-1, présente en permanence, est responsable d'une production de prostaglandine de base. L'expression des COX-2, en revanche, est induite par des agents inflammatoires (TNF, cytokines, qui stimulent par la voie des MAP-kinase l'expression du gène codant la COX-2), et c'est ce surplus de prostaglandines synthétisées en présence de COX-2 en situation inflammatoire qui est responsable de l'augmentation globale du taux de prostaglandine en situation d'inflammation. L'action de la COX (sous-types 1 et 2 indifféremment) est inhibée par les AINS (Anti Inflammatoires Non Stéroïdiens).

I.1.3.5 Les prostaglandines

Les prostaglandines sont des métabolites de l'acide arachidonique, obtenus à partir de phospholipides membranaires par action de phospholipases (Oeseburg *et al.*, 2012). Ce sont des molécules liposolubles destinées à la sécrétion dans le milieu extracellulaire, jouant des rôles importants dans les organismes vivants (Soleti *et al.*, 2012). En effet, les prostaglandines sont des agents de signalisation paracrine et autocrine qui activent de nombreux RCPG (récepteurs membranaires à 7 segments transmembranaires couplés à des protéines G). Chaque prostaglandine possède 20 atomes de carbone dont un cycle à 5 atomes de carbone. Ce sont des médiateurs chimiques qui possèdent divers effets physiologiques. Les prostaglandines sont le produit final d'une chaîne de réactions commençant par la libération d'acides gras insaturés à partir des cellules. La conversion des acides gras en divers prostaglandines est réalisée via un complexe enzymatique appelé complexe "prostaglandine synthétase" ou "cyclooxygénase", qui est libéré à partir de la membrane cellulaire.

Il existe plusieurs étapes dans la conversion des acides gras en prostaglandines (figure 1). Les prostaglandines ne sont pas uniquement synthétisées lorsque les tissus sont infectés, mais sont constamment dans l'organisme.

Les prostaglandines sont également incriminées dans la perception de la douleur dans le système nerveux. Plusieurs substances contribuent au processus de l'inflammation, et parmi elles, les prostaglandines sont l'une des plus importantes. Les prostaglandines sont l'un des médiateurs qui causent une augmentation de la circulation sanguine, du chimiotactisme et un dysfonctionnement subséquent des tissus et des organes.

Les prostaglandines font partie de la classe des prostanoides, qui contient aussi les thromboxanes et les prostacyclines. Les prostanoides sont eux-mêmes une sous-catégorie des eicosanoïdes. La production de prostaglandines de la série indice 2 nécessite de l'acide arachidonique (Konczak *et al.*, 2011). Il peut être apporté par l'alimentation, mais est aussi produit de façon endogène par l'organisme, par dégradation par les phospholipases A2 de molécules de phosphatidyl-choline (un phospholipide membranaire). L'acide arachidonique subit ensuite soit l'action de la cyclo-oxygénase, soit celle de la lipoxygénase. La cyclo-oxygénase conduira à la formation de thromboxane, de la prostacycline (appelée aussi prostaglandine I2) et des prostaglandines D, E et F (Arnold *et al.*, 2011). La lipoxygénase, elle, est active dans les leucocytes et les macrophages et forme les leucotriènes.

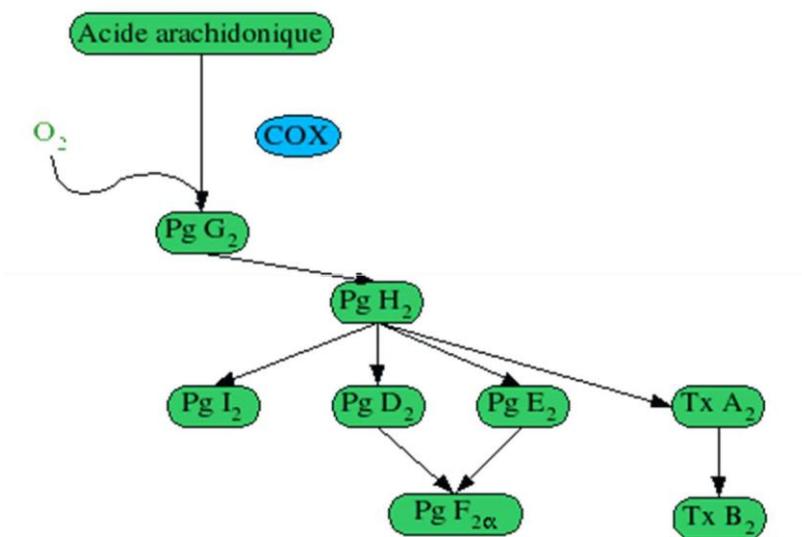


Figure 1: Formation des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (Kim, Kim *et al.* 2011)

I.1.3.6 Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) sont des espèces chimiques oxygénées telles que des radicaux libres, des ions oxygénés et des peroxydes, rendus chimiquement très réactifs par la

présence d'électrons de valence non appariés (Scott *et al.*, 2013). Il peut s'agir par exemple de l'anion superoxyde O_2^- , de l'oxygène singulet O_2^* , du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , ou encore de l'ozone O_3 . La figure 2 représente les effets des espèces réactives de l'oxygène sur les cellules de l'organisme.

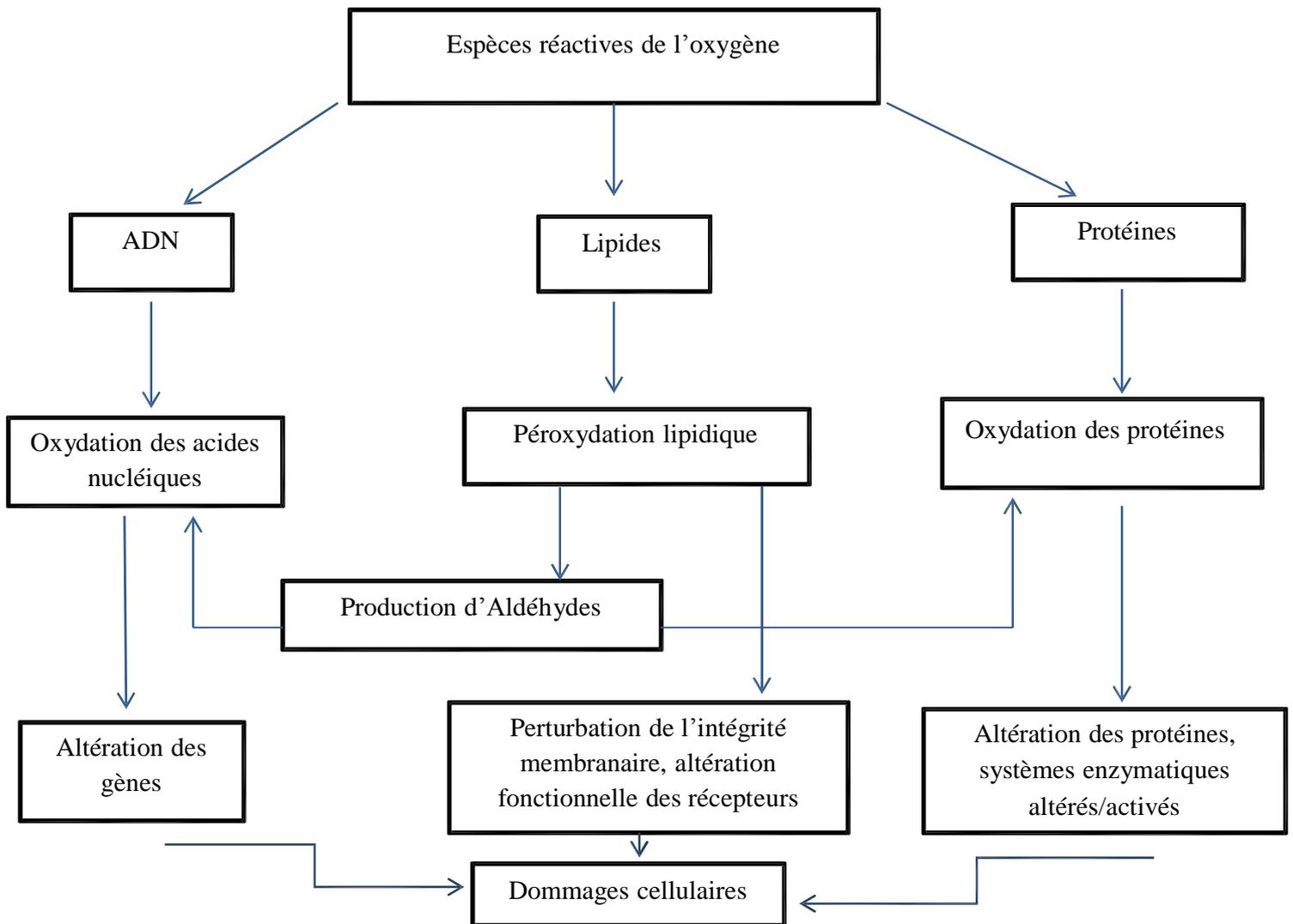
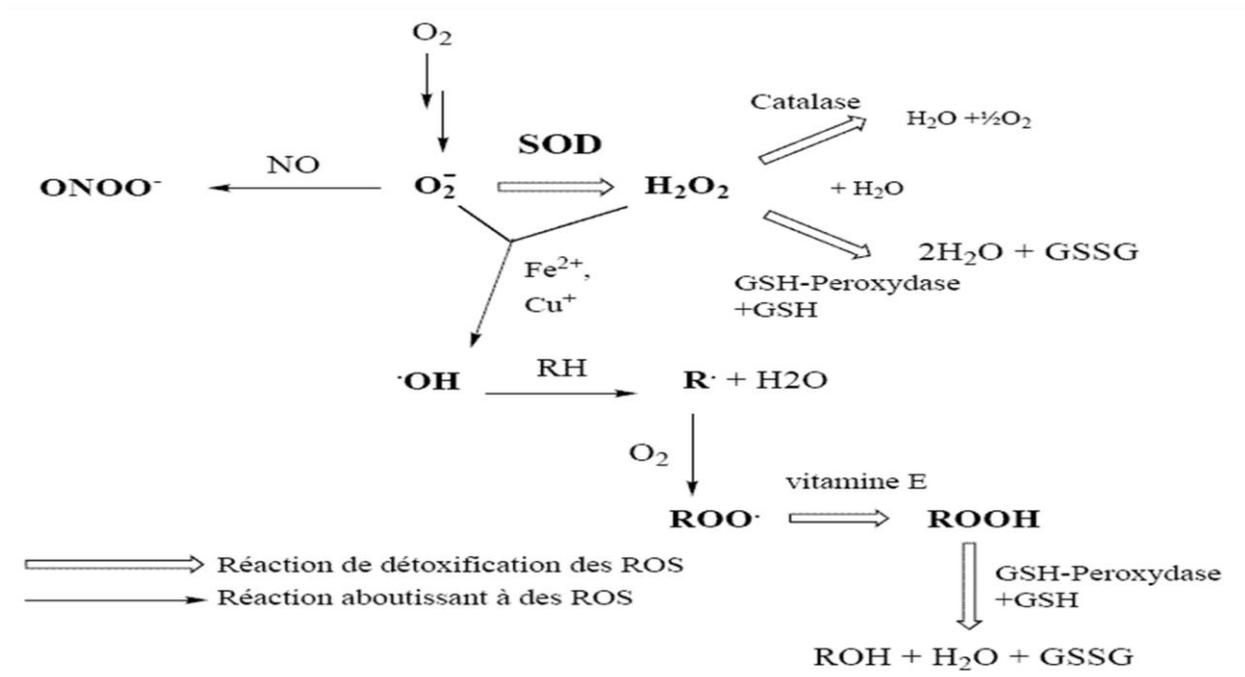


Figure 2: Effets des espèces réactives de l'oxygène sur les cellules de l'organisme (Tanaka *et al.*, 2012)

Dans certains cas, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent s'attaquer aux membranes phospholipidiques, aux protéines et à l'ADN. Il existe dans la cellule plusieurs enzymes pour la détoxification des espèces réactives de l'oxygène à savoir la superoxyde dismutase, la catalase, la

glutathione peroxydase et réductase, et le glucose-6-phosphate déshydrogénase (Komolafe *et al.*, 2013).



ONOO⁻ : péroxynitrite, **SOD** : superoxyde dismutase, **GSH** : glutathion

Figure 3: Différentes voies et étapes de formation des espèces réactives de l'oxygène (Vanden Berghe, 2012).

Bien que longtemps considérées comme des molécules purement toxiques, des évidences récentes suggèrent que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) fonctionnent comme des régulateurs des fonctions physiologiques et des mécanismes de signalisation intracellulaire. Des évidences convergentes suggèrent que les ROS régulent plusieurs paramètres physiologiques allant de la réponse à la stimulation par les facteurs de croissance à la génération de la réponse inflammatoire, et qu'une dérégulation de la production des ROS pourrait contribuer au développement de plusieurs maladies chez les humains (Komolafe *et al.*, 2013).

I.1.4 Cytokines impliquées dans l'inflammation et leur rôle

Les cytokines correspondent à des glycoprotéines qui peuvent être membranaires, ou sécrétées suite à une stimulation. Elles sont une centaine et classées par classes suivant l'homologie de structure. Parmi elles on trouve le Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), les interleukines, les chimiokines et les interférons (Olleros *et al.*, 2010). Chaque cytokine peut être synthétisée par plusieurs types de cellules et agir sur un grand nombre de cellules cibles sur lesquelles elle aura des actions variées. Les cytokines agissent selon différents modes d'action: autocrine, paracrine et endocrine. Les cytokines ne peuvent agir que par l'intermédiaire de récepteurs qui doivent être présents sur les cellules. La plupart de ces récepteurs n'ont pas d'activités enzymatiques propres et sont associés à d'autres protéines cellulaires.

I. 1.4.1 Les cytokines pro-inflammatoires

Les cytokines pro-inflammatoires (en particulier les interleukines 1, 6 et 8 et les facteurs nécrosant les tumeurs) sont des facteurs régulateurs de l'inflammation, de la fièvre, du sommeil, de l'hématopoïèse (formation des cellules du sang) ou de la destruction osseuse (Qiao *et al.*, 2013).

I.1.4.1.a Le Tumor Necrosis Factor α

Le TNF- α est la plus importante des cytokines pro-inflammatoires et est synthétisée par la plupart des cellules immunitaires (Wang *et al.*, 2013). Elle agit au niveau du foie lors d'une infection en induisant la synthèse de molécules de la phase aiguë de l'inflammation, et en agissant également au niveau de l'endothélium vasculaire par induction la synthèse de protéines membranaires qui seront indispensable à la diapédèse des cellules immunitaires (Kim *et al.*, 2007).

I.1.4.1.b L'interleukine 1

L'IL-1, également appelée LAF (leucocyte activating factor) est libérée surtout par les macrophages mais aussi par d'autres cellules, lymphocytes B, lymphocytes T et cellules endothéliales (Corbett *et al.*, 1996). Contrairement aux autres cytokines, l'IL1 peut être stockée sous la forme d'un précurseur qui est ensuite hydrolysé en IL1 par l'enzyme de conversion de l'IL1 ou caspase I. Les effets de l'IL1 sont assez semblables à ceux du TNF (Ratanachaiyavong *et al.*, 2010). L'IL1 a en plus un effet sédatif (McCarthy *et al.*, 2013).

I.1.4.1.c L'interleukine 6

L'IL6 est une cytokine pro-inflammatoire agissant au niveau du foie lors d'une infection, afin d'activer la synthèse de molécules de la phase aigüe de l'inflammation (Hu *et al.*, 2013). Plusieurs cellules immunitaires produisent cette interleukine suite à leur activation parmi lesquelles les macrophages et les microglies (Huttunen *et al.*, 2005).

I.1.4.1.d Les interférons

Les interférons sont des cytokines dont la production est induite suite à une infection virale, une infection bactérienne, une infection parasitaire ou à la présence de cellule tumorales, et ceci en réponse à la présence d'acide nucléique étranger à l'organisme (Choi *et al.*, 1995). Ils ont pour action principale d'interférer avec la réplication virale, mais ils ont également une action antibactérienne, antiproliférative et d'activation d'autres cellules immunitaires telles que les cellules NK, les macrophages et les lymphocytes (Solache *et al.*, 2004).

On distingue deux groupes d'interférons suivant les récepteurs qu'ils activent :

Les interférons de type 1 prennent en compte les interférons α et interférons β et jouent un rôle dans la réponse immunitaire innée (Fox et Chambers, 2000). Ils sont produits par les cellules du système immunitaire mais également par un grand nombre d'autres cellules (cellules épithéliales), suite à différents types d'interactions:

- L'interaction d'ARN double brin viraux avec le récepteur TLR-3.
- L'interaction d'ARN simple brin viraux avec le récepteur TLR-9.
- L'interaction d'ADN bactérien avec le récepteur TLR-9.
- L'interaction des LPS présents à la surface des bactéries gram négatives avec le TLR-4.

Les interférons de type 2 prennent en compte les interférons γ qui sont produit uniquement par les cellules immunitaires (LB, LT, cellules NKT) lors de la réaction immunitaire adaptative. Ils ont différents rôles plus ou moins direct au sein de l'organisme: protection contre les infections virales, stimulation de l'activité phagocytaire des macrophages, stimulation de la maturation des LT et LB, augmentation de l'expression des molécules des

complexes majeurs d'histocompatibilités I et II par les macrophages, activation des polynucléaires neutrophiles et des cellules NK.

I. 1.4.2 Les cytokines anti-inflammatoires

Les cytokines anti-inflammatoires sont une série de molécules immunorégulatrices qui contrôlent la réponse liée aux cytokines pro-inflammatoires (Opal et DePalo, 2000). Ces cytokines agissent en concert avec des inhibiteurs spécifiques de cytokines et des récepteurs de cytokines solubles pour réguler la réponse immunitaire chez les humains. Leur rôle physiologique dans l'inflammation est de plus en plus reconnu. Les cytokines anti-inflammatoires les plus connues sont IL10, IL4, et l'IL13.

I. 1.4.2.a L'interleukine 10

Bien que le rôle majeur de la réponse immunitaire soit la défense de l'organisme contre une variété de microorganismes, une réponse immunitaire excessive pourrait entraîner des dommages. L'organisme a donc besoin d'un mécanisme anti-inflammatoire pour prévenir la réactivité contre le soi. L'Interleukine-10 (IL-10) est une cytokine présentant des propriétés anti-inflammatoires et impliquée dans la pathogénicité de plusieurs maladies (Wang *et al.*, 2012). L'IL-10 a été premièrement décrite comme une cytokine dérivée des lymphocytes T helper TH2, mais des études supplémentaires ont montré que cette cytokine est exprimée non seulement par plusieurs cellules de l'immunité spécifique, incluant les cellules B et T, mais aussi par les cellules de l'immunité innée incluant les cellules dendritiques (DCs), les macrophages, les mastocytes, et les cellules natural killer (NK) (Kubo et Motomura, 2012).

I. 1.4.2.b L'interleukine 13

L'IL13 stimule la croissance et la différenciation des lymphocytes B, inhibe les cellules Th1 et la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (Ingram et Kraft, 2012). L'Interleukin-13 (IL-13) est connue comme jouant un rôle régulateur central dans la synthèse des immunoglobulines E (IgE), ainsi que de l'hypersécrétion du mucus et des fibroses (Sapkota *et al.*, 2011).

I.1.5 Molécules utilisées pour mimer l'inflammation: Les Lipopolysaccharides et l'Interféron gamma

Plusieurs composés sont utilisés pour stimuler la production des médiateurs de l'inflammation *in vitro*. Parmi eux, les lipopolysaccharides et l'INF γ sont les plus utilisés. Les lipopolysaccharides (LPS) induisent le choc endotoxique via la production de médiateurs de l'inflammation tels que le tumor necrosis factor (TNF)-alpha et l'oxyde nitrique (NO) ([Koyama et al., 2006](#)).. L'inhibition de la synthèse du NO induite par les LPS/IFN-gamma avec l'analogue de la L-arginine, le N(G)-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) a été accompagné d'une sur-régulation significative du mRNA de l'iNOS ([Brune et al., 2000](#)).

I. 1.6 Mécanismes impliqués dans la transduction du signal cellulaire

I. 1.6. 1. Le Nuclear factor kappaB (NF κ B)

Parmi les multiples facteurs de transcription retrouvés dans les cellules de mammifères, le plus connu par les scientifiques et cliniciens est le facteur nucléaire κ B (NF κ B). En plus de son rôle déterminant comme régulateur des réponses immunes innées et spécifiques, le NF κ B contribue également à la pathologie de plusieurs maladies chez l'homme ([Ross et Harrison, 2013](#)). Le NF κ B stimule la transcription de plus de 150 gènes différents codant pour des cytokines, les molécules d'adhésion, les immunorécepteurs, les protéines de la phase aigüe, les enzymes, et les régulateurs du cycle cellulaire et de l'apoptose ([Su et al., 2013](#)). La transcription de ces gènes est stimulée en réponse à la fixation du NF κ B à une séquence spécifique de 10 paires de base sur l'ADN (GGGRNNYYCC, avec R correspondant à une purine, et Y correspondant à une pyrimidine, et N peut être n'importe quelle base) située soit en amont de l'activateur ou en aval du promoteur sur le gène ([Bradley et al., 2008](#)). La fixation du NF κ B sur ces séquences est fortement régulée par la fonction inhibitrice de la protéine I κ B- α qui forme un complexe avec le NF κ B qui masque les domaines fonctionnels des facteurs de transcription requis pour sa migration dans le noyau cellulaire et ses activités de fixation au DNA ([Halpert et al., 2010](#)). Le mécanisme par lequel le I κ B- α se lie au NF κ B est actuellement bien connu (figure 4). Suite à une stimulation de la cellule par un signal extracellulaire, comme l'interaction entre le TNF α avec son récepteur, le complexe kinase I κ B (IKK) est activé. Le complexe IKK catalyse ensuite la phosphorylation de

l'I κ B- α au niveau de deux résidus N terminaux des sérines (ser 32 et 36) qui ensuite transforme l'I κ B- α en un substrat pour l'ubiquitination et finalement pour la dégradation par le protéasome 26 S (Delgado et Ganea, 2001). Un nombre remarquable d'inducteurs du signal NF κ B ont été décrit, incluant une pléthore de cytokines et une large variété de produits dérivés de virus et de bactéries. De par l'habileté du NF κ B à être activé en réponse à cette diversité de stimuli extracellulaires et son activation transcriptionnelle subséquente d'un nombre élevé de gènes cibles, il n'est pas surprenant que ce facteur de transcription soit impliqué dans le processus de plusieurs maladies (Shibasaki *et al.*, 2001). Les maladies gastro-intestinales dans lesquelles le NF κ B est désigné comme contribuant à la pathogénicité incluent les maladies inflammatoires de l'intestin, le cancer et les réponses aux infections par les virus et les bactéries (Khalili *et al.*, 1997).

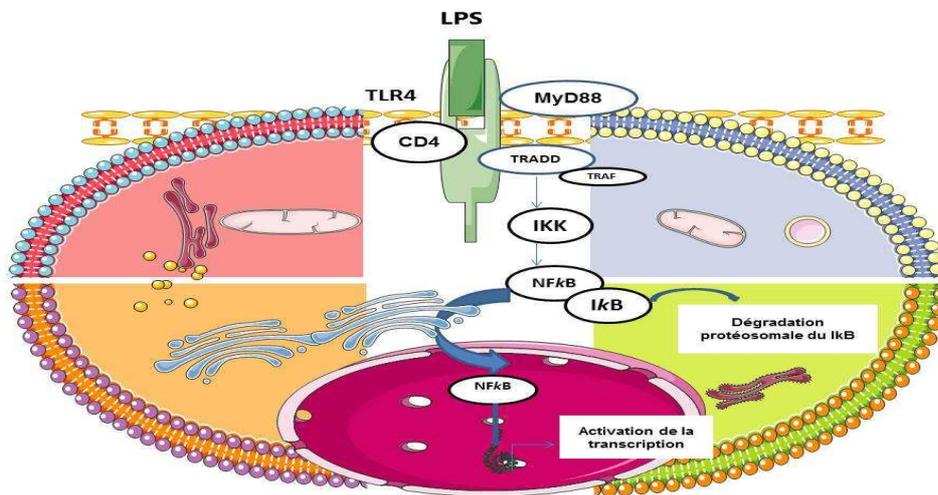


Figure 4: Activation de la voie de signal NF κ B suite à une fixation des LPS sur leur récepteur sur la membrane cellulaire (Owona, 2013)

I.1.6. 2. Le Mitogen Activated protein kinase

La voie de signalisation cellulaire MAPK/ERK est une chaîne de protéines dans la cellule qui communique un signal à partir d'un récepteur sur la surface de la cellule vers le DNA dans le noyau de la cellule (Lee *et al.*, 2013). Le signal commence lorsqu'une molécule de signal se lie à un récepteur sur la surface cellulaire et se termine lorsque le DNA dans le noyau exprime une protéine et produit certains changements dans la cellule par exemple la division cellulaire (Kumar

et al., 2013). La voie de signal contient plusieurs protéines parmi lesquelles la MAPK (originellement appelé ERK), qui communiquent en ajoutant des groupes phosphates à des protéines voisines, encore connue comme la voie Ras-Raf-MEK-ERK (*Liu et al., 2013*). Le JNK est un membre de la famille « mitogen-activated protein kinase » (MAPK) et joue un rôle essentiel dans la réponse inflammatoire médiée à travers les TLRs. Il est reporté que l'activation des protéines du MAPK, p38 et JNK est impliquée dans le stress oxydant au niveau du réticulum endoplasmique (*Tang et al., 2013*). Lorsque l'une des protéines de la chaîne du signal subit une mutation, elle peut être convertie en une position "allumée" ou "éteinte", qui est une étape primordiale dans le développement de plusieurs cancers. Les composants de la voie de signal MAPK/ERK ont été découverts lorsqu'ils ont été retrouvés dans les cellules cancéreuses (*da Silva et al., 2013*).

I.1.7 Polyphénols comme molécules multifonctionnelles et rôle des Sirtuines

L'investigation du mécanisme d'action des polyphénols naturels a révélé qu'ils modulent les réponses cellulaires face au stress oxydatif et à plusieurs voies de signalisation cellulaire. Le stress oxydatif est impliqué dans le développement de plusieurs maladies ou pourrait accentuer leurs symptômes. Le stress est lié à plusieurs maladies comme le cancer, l'inflammation, et la neurodégénération (*Creager et al., 2002; Visconti et Grieco, 2009; Lahiri et al., 2009*). Le stress oxydatif apparaît comme étant le principal facteur responsable de plusieurs maladies et plusieurs exemples de maladies dans lesquelles le stress oxydatif joue un rôle majeur ont été décrits (*Johnstone et Baylin, 2010*). Des perturbations au niveau de l'état redox de la cellule peuvent causer des dommages à travers la production de radicaux libres qui affectent les molécules clés de la cellule comme les protéines, les lipides et le DNA. Les Sirtuines (SIRT) sont une classe de HDAC (Histones déacéthylases) qui régule le métabolisme, l'inflammation, le vieillissement, l'apoptose cellulaire et plusieurs autres pathologies. Il est actuellement établi que le SIRT1 peut directement ou indirectement influencer le statut redox de la cellule (*Smith et al., 2005*). Il a été démontré que le SIRT1 réduit le stress oxydatif cellulaire à travers la régulation du FOXO3a (*Gupta et al., 2009*) (*Nalabothula et Carrier, 2011*).

La modulation des voies de signalisation cellulaire par les polyphénols naturels, responsable de plusieurs effets bénéfiques souvent attribués à ces composés, est médiée via des modifications chromatine-épigénome (Ghantous *et al.*, 2012). Parmi les enzymes HDACs étudiés pour leurs effets sur les maladies causées par des changements épigénétiques, le SIRT1 a été le plus étudié. L'effet épigénétique du SIRT1 est dû à son habileté à déacétyler plusieurs facteurs de transcription tels que le p53, le NF- κ B, le FOXO, et des protéines histones, régulant ainsi le métabolisme, la survie cellulaire, l'inflammation, la fonction immunitaire et plusieurs autres désordres (Nelson *et al.*, 2009). Il a été prouvé que plusieurs polyphénols comme l'EGCG et la curcumine ont des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires via une modulation d'importants signaux cellulaires tels que le NF- κ B et le MAPK (Collett et Campbell, 2004; Harrington *et al.*, 2011). Ces polyphénols activent aussi le SIRT1 dans plusieurs études (Alcain et Villalba, 2009). Le Resveratrol inhibe l'activation des facteurs de transcription tels que le NF- κ B, et inhibe aussi l'activation du COX-2 et de l'iNOS via une inhibition de l'activation du NF- κ B (Biesalski, 2007). Le Resveratrol inhibe également l'activation du c-Jun N-terminal kinases (JNK) et du MAPK (Weng *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2012). La Curcumine, un composé jaune obtenu du rhizome de *curcuma longa L.*, a été reporté comme inhibant le COX-2, le NF- κ B, le JNK, et le NO, à travers une activation du SIRT1 (Rahman et Chung, 2010). L'EGCG, le principal agent thérapeutique contenu dans les polyphénols du thé, décroît l'activité du NF- κ B à travers une hypo-acétylation du RelA/P65 en inhibant directement l'activité du HAT (Jung *et al.*, 2009). Ce composé inhibe également l'activité du NF- κ B des cellules T régulatrices (Tregs) via un accroissement de l'activité de l' HDAC₂ et de son expression dans ces cellules (Jialal *et al.*, 2010) (Park *et al.*, 2012). Le composé EGb761 protège les cellules du neuroblastome N2a contre la neurotoxicité induite par l'amyloïde β à travers l'activation du SIRT1, entraînant une réduction de l'activité du NF- κ B en favorisant la réaction d'acétylation de la sous unité p65 de la Lys 310 (Biesalski, 2007). Cet extrait peut aussi prévenir l'activation des voies de signal ERK1/2 et JNK induits par l'amyloïde β , suggérant un rôle clé du SIRT1 dans les voies de contrôle du signal cellulaire pour le contrôle de la neurotoxicité. Le SIRT1, considéré comme un gène de longévité, est connu comme induisant la viabilité des neurones et peut être activé en stimulant la voie de signal MAPK (Vieth *et al.*, 2012). Les tableaux ci-dessous représentent l'effet des polyphénols sur les médiateurs de l'inflammation ainsi que sur différentes voies de signalisation cellulaire.

Tableau 1: Polyphénols et leurs effets sur l'expression des médiateurs de l'inflammation

Composé	Modèle Cell/animal	Effets	Références
TFB	Cellules HUVEC	Inhibition de l'IL8, du TNF α , et du NO	(Yuan <i>et al.</i> , 2012)
Chrysin	Souris	Atténuation de l'allergie et de l'inflammation	(Gu <i>et al.</i> , 2012)
Sudachin	Cellules Raw 264	Inhibition du NO par une suppression de l'expression de l'iNOS	(Tada <i>et al.</i> , 2012)
Quercetin	Souris	Accroissement des niveaux hépatiques du microRNA-122 et microRNA-125b	(Wagner <i>et al.</i> , 2012)
Baicalein	Souris Swiss albinos	Interfère avec les expressions du COX-2, du MMP-2 et du MMP-9 <i>in vivo</i>	(Selvamani <i>et al.</i> , 2012)
Astragalin	Souris	Inhibition du TNF α , de l'IL6, et de l'IL1	(Chen <i>et al.</i> , 2012)
Norkurarinol	Rotavirus	Inhibition de la réplication du rotavirus	(Lee <i>et al.</i> , 2012)
Ampelopsin	Raw 264.7	Réduction de l'inflammation, inhibition du NO, l'IL1 β , l'IL6 et le TNF α	(Xin <i>et al.</i> , 2012)
Beta-cryptoxantin	Rats	Accroît les activités des enzymes détoxifiantes du foie	(Tanaka <i>et al.</i> , 2012)
Hesperidin	Rats Souris	Supprime l'expression des cytokines pro-inflammatoires Stimule l'immunocompétence	(Tanaka <i>et al.</i> , 2012)

	Cellules endothéliales	Stimule la phosphorylation du Src, Akt, AMP kinase, et du NO synthase de l'endothélium	(Jung <i>et al.</i> , 2011)
Procyanidins	Raw 264.7	Prévient l'obésité, l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires	(Calay <i>et al.</i> , 2012)
2-hydroxy-4,-methoxychalcone	Human aortic smooth muscle cells	Inhibe la prolifération et l'inflammation en stimulant l'expression du PPrY	(Chang <i>et al.</i> , 2012)
Aurentiacin	Macrophages	Inhibe le NO, abaisse l'expression de l'iNOS, réduit les niveaux de mRNA du TNF α , et de l'IL6	(Kim <i>et al.</i> , 2012)
SIF	Rats	<ul style="list-style-type: none"> Réduit la production de l'IL1β, du TNFα, et de l'iNOS Réduit la régulation du TLR2, FPR, Myd88 induite par l'Abeta1 -42	(Zhou <i>et al.</i> , 2012)
EGCG	Souris	Supprime les fibroses péritonéales	(Nishino <i>et al.</i> , 2012)
Luteolin	Microglies BV2	<ul style="list-style-type: none"> Inhibe l'expression de l'iNOS, et du COX2 	(Bi <i>et al.</i> , 2011)

		<ul style="list-style-type: none"> Inhibe l'expression du TNFα, de l'IL1β, du NO et des PGE2 	
ICT (derivé de l'icariin)	Cellules THP, macrophages humains	<ul style="list-style-type: none"> Inhibe le TNFα Abaisse l'expression du CD14/TLR4 	(Zhou <i>et al.</i> , 2012)
Quercetin	Fibroblastes	<ul style="list-style-type: none"> Atténue l'expression de ICAM-1, IL6, IL8 et du mRNA du COX-2 Inhibe les expressions des mRNAs de l'IL1β, l'IL6, de l'IL8 	(Lee <i>et al.</i> , 2011)
Curcumin	Chats	Effets bénéfiques sur le foie et améliore l'inflammation due à l'obésité	(Freuchet <i>et al.</i> , 2011)
Xanthohumol	Rats Wistar	Réduit l'inflammation, le stress oxydatif et l'angiogenèse	(Costa <i>et al.</i> , 2012)
Silymarin	Rats transgéniques F344 gpt delta	Agent anti-génotoxique	(Yasui <i>et al.</i> , 2011)
Licochalcone C	Cellules THP-1	Réduit la production des radicaux superoxide et réduit l'activité de l'iNOS	(Pesce <i>et al.</i> , 2011)
Pycnogenol	Cellules rénales tubulaires	Module l'apoptose en supprimant le stress oxydant et l'inflammation	(Kim <i>et al.</i> , 2011)

Naringenin	HaCaT humains Souris	Inhibe le TNF-alpha, décroît l'infiltration des cellules de l'inflammation	(Liao <i>et al.</i> , 2011) (Maruyama <i>et al.</i> , 2011)
5,7-dimethoxyflavone	Raw264.7	Inhibe la production du NO, inhibe l'expression du mRNA de l'iNOS	(Matsuda <i>et al.</i> , 2011)
Trimethylapigenin	Raw264.7	Inhibe la production du NO, inhibe l'expression du mRNA de l'iNOS	(Matsuda <i>et al.</i> , 2011)
Tetramethyluteolin	Raw264.7	Inhibe la production du NO, inhibe l'expression du mRNA de l'iNOS	(Matsuda <i>et al.</i> , 2011)
Sappanchalcone	Cellules des ligaments	Induit le HO-1 et protège les cellules HDP contre le H2O2	(Lee <i>et al.</i> , 2010)
Butrin	Mastocytes humains	Suppression du TNF α , l'IL6 et l'IL8	(Akhtar <i>et al.</i> , 2010)
Isobutrin	Mastocytes humains	Suppression du TNF α , de l'IL6 et de l'IL8	(Akhtar <i>et al.</i> , 2010)
Butein	Mastocytes humains	Suppression du TNF α , de l'IL6 et de l'IL8	(Akhtar <i>et al.</i> , 2010)
Tricin	Souris CD-1	Réduit la prolifération des cellules de l'adénocarcinome	(Yasui <i>et al.</i> , 2009)
2'-hydroxychalcone	Raw 264.7	Inhibition de la production de prostaglandine E2	(Park <i>et al.</i> , 2009)
Isopedicin	Neutrophiles humains	Inhibition de la production de l'anion superoxyde	(Li <i>et al.</i> , 2009)

THF	Raw 264.7	Abaisse l'expression du mRNA du TNF α et supprime sa libération	(Cao <i>et al.</i> , 2008)
5-O-demethylnobiletin	Souris	Réduit la formation des œdèmes et de l'inflammation	(Recio <i>et al.</i> , 2006)
Dosmalfate	Rats	Activation de l'expression du récepteur EGF	(La Casa <i>et al.</i> , 2003)
Ginkgetin	Raw 264.7	Inhibe la production des prostaglandines à partir des cellules traitées par les LPS	(Han <i>et al.</i> , 2002)
Daidzein	Porcs	Améliore la prise de poids et l'alimentation des porcs pendant les périodes de virémie	(Stahly <i>et al.</i> , 2001)

Légende: Ce tableau donne une classification de différents polyphénols ainsi que leur effet sur l'expression des médiateurs de l'inflammation dans divers modèles cellulaires ou animaux.

Tableau 2: Polyphénols et effets sur les voies de signalisation cellulaire.

Substance	Signal	Références
TFB	Supprime le NF κ B	(Yuan <i>et al.</i> , 2012)
Astragalin	Supprime le NF κ B	(Chen <i>et al.</i> , 2012)
Norkurarinol	Supprime le NF κ B et l'AP-1	(Lee <i>et al.</i> , 2012)
2-hydroxy-4'-methoxychalcone	Accroît l'expression du PPr γ	(Chang <i>et al.</i> , 2012)
Aurentiacin	Inhibe le NF-kappaB/p65	(Kim <i>et al.</i> , 2012)
EGCG	Inhibe le NF κ B	(Nishino <i>et al.</i> , 2012)
ICT	Atténue l'activation du NF κ B du MAPK	(Zhou <i>et al.</i> , 2012)
Licochalcone C	Décroit l'expression du NF κ B	(Pesce <i>et al.</i> , 2011)
Pycnogenol	Supprime la translocation nucléaire du NF κ B	(Kim <i>et al.</i> , 2011)
Luteolin	<ul style="list-style-type: none"> • Bloque l'activation du NF κB induite par le LPS • Inactive le PI3-Akt • Interfère avec le MAPK • Inhibe le MEK/ERK et le PI3/Akt 	<p>(Bi <i>et al.</i>, 2011)</p> <p>(Jin <i>et al.</i>, 2011)</p> <p>(Esser <i>et al.</i>, 2011)</p> <p>(Li <i>et al.</i>, 2010)</p>
Chrysin	Inhibe le NF κ B et la caspase-1	(Lee <i>et al.</i> , 2011)
Naringenin	Décroit l'expression de la protéine NF κ B p65 dans le noyau	(Liao <i>et al.</i> , 2011)

Baicalein	Modulation du NF <i>κ</i> B et du FOXOs	(Kim <i>et al.</i> , 2011)
Quercetin	Décroit la phosphorylation du JNK et c-JUN Décroit l'expression de la protéine tyrosine phosphatase-1B	(Chuang <i>et al.</i> , 2011)
Genistein	Interfère avec l'ERK et le MAPK	(El-Shishtawy <i>et al.</i> , 2010)
Baicalin	Inhibe l'activation du NF <i>κ</i> B	(Jingcheng <i>et al.</i> , 2010)
Icariin	Réduit les niveaux de NF <i>κ</i> B p65	(Liu <i>et al.</i> , 2010)
Butrin	Inhibe le NF <i>κ</i> B	(Akhtar <i>et al.</i> , 2010)
Isobutrin	Inhibe le NF <i>κ</i> B	(Akhtar <i>et al.</i> , 2010)
Butein	Inhibe le NF <i>κ</i> B	(Akhtar <i>et al.</i> , 2010)
Xanthohumol	Inhibe le NF <i>κ</i> B	(Calhau <i>et al.</i> , 2008)
Naringenin	Bloque l'activation du NF <i>κ</i> B	(Shouji <i>et al.</i> , 2006)
Ampelopsin	Supprime l'activation du p13K/Akt/NF- <i>κ</i> B induite par les ROS	(Xin <i>et al.</i> , 2012)

Légende: Ce tableau donne une classification de différents polyphénols ainsi que leur effet sur de multiples voies de signalisation cellulaire

Tableau 3: Polyphénols et doses utilisées dans le traitement des maladies liées à l'inflammation.

Composé	Modèle utilisé	Dose	Référence
Baicaline	Souris	12 mg/kg	(Selvamani <i>et al.</i> , 2012)
Astragaline	Souris	25, 50, 75 mg/kg	(Chen <i>et al.</i> , 2012)
Quercetin	Souris	100 ppm	(Tan <i>et al.</i> , 2011)
3,4-dihydroxychalcone	Souris	35,7 mg/kg	(Caruso <i>et al.</i> , 2013)
3,4,3',5',6',7',8'-heptaméthoxyflavone	Rat	100 mg/kg	(Manthey et Bendele, 2008)
Narirutin	Souris	10 mg/kg	(Ha <i>et al.</i> , 2013)
Rutin	Rats Wistar	75 et 150 mg/kg poids corporel	(Seth <i>et al.</i> , 2011)
Luteolin	Peau humaine	12µg/ml	(Kumar <i>et al.</i> , 2013)
Baicalin	Rats SD	20mg/kg	(Jingcheng <i>et al.</i> , 2010)
Icariin	Souris	20mg/kg	(Liu <i>et al.</i> , 2010)
Baicalein	Rats	20 mg/kg, i.v	(Lee <i>et al.</i> , 2007)
Narirutin	Souris	0.1, 1 ou 10 mg/kg pc	(Ohno <i>et al.</i> , 2007)
Epicatechin	Souris	15 mg/kg pc	(Das <i>et al.</i> , 2012)

Légende: Ce tableau donne une classification de différents polyphénols ainsi que les doses utilisées dans le traitement de diverses maladies liées à l'inflammation.

Tableau 4: Polyphénols et plantes utilisées pour la recherche de nouveaux composés.

Composé	Source	Référence
Homoplantagin	Salvia plebeia R. BR	(Wang <i>et al.</i> , 2012)
Chrysin (5,7-dihydroxyflavone)	propolis	(Lee <i>et al.</i> , 2011)
5-O-demethylnobiletin	Sideritis tragoriganum	(Recio <i>et al.</i> , 2006)
Luteolin	Aliments et fruits	(Jin <i>et al.</i> , 2008)
Baicalein	Scutellaria baicalensis Georgi	(Lee <i>et al.</i> , 2007)
wogonin	Scutellaria radix	(Lim <i>et al.</i> , 2003)
Morin	fruits et herbes Chinoises	(Hou <i>et al.</i> , 2003)
Licocalchone-C	Glycyrrhiza glabra	(Pesce <i>et al.</i> , 2011)
Puerarin	Pueraria lobata	(Liu <i>et al.</i> , 2012)
Activin	grape seed	(Righi <i>et al.</i> , 2002)
Glabridin	Racines de licorice	(Yoon <i>et al.</i> , 2005)
Biochanin-A	alfalfa	(Giri <i>et al.</i> , 2011)
Ginkgetin	Ginkgo biloba	(Han <i>et al.</i> , 2002)
Licochalcone A	Licorice	(Park <i>et al.</i> , 2008)
Resveratrol	Grapes	(Villegas <i>et al.</i> , 2004)
Norkurarinol	Racines de Sophora flavescens	(Lee <i>et al.</i> , 2012)
Apigenin	Fruits et légumes	(Batra <i>et al.</i> , 2007)
Butrin, isobutrin, et Butein	Butea monosperma	(Akhtar <i>et al.</i> , 2010)
Sudachitin	Citrus sudachi	(Tada <i>et al.</i> , 2012)
Baicaline	Racines de Scutellaria	(Wang <i>et al.</i> , 2012)

Tableau 5: Polyphénols et effets sur les médiateurs de l'inflammation.

Composé	Effet	Référence
2'-hydroxychalcone (2-HC)	Réduit la production de nitrite induite par le LPS et la production du TNF-alpha	(Foresti et al., 2006)
Polyphénols du vin rouge	Inhibe la production du NO et de l'iNOS	(Andriambelason et al., 2002)
Theaflavin-3,3'-digallate	Inhibe l'activation du NFkB	(Tsai et al., 1999)
EGCG	Inhibe le NO et ROS	(Formoso et al., 2007)
Flavones	Inhibent le NO	(Dauzonne et al., 2004)
Quercetin/catéchine	Inhibe la protéine kinase C	(Di Santo et al., 2006)

I.2 Régulation de l'inflammation par les polyphénols, le stress oxydant et la maladie d'Alzheimer

I.2.1 L'inflammation

Plusieurs polyphénols sont de nos jours étudiés pour leur capacité à réguler l'inflammation. Par exemple, les flavonoïdes totaux de *Bidens bipinnata*, une plante traditionnelle chinoise ont présenté une inhibition de la production des cytokines proinflammatoires chez les cellules endothéliales stimulées par le sérum de patients souffrant de Henoch-Schonlein purpura [\(Yuan et al., 2012\)](#). La Sudachitine, un polyméthoxyflavone isolé de citrus sudachi, supprime la réponse inflammatoire chez les macrophages Raw 264.7 induits par les LPS, à travers une inhibition de la production d'oxyde nitrique et de l'expression de l'iNOS [\(Tada et al., 2012\)](#). La Quercetin atténue l'expression des gènes de l'inflammation dans le foie de souris [\(Wagner et al., 2012\)](#). La baicalin inhibe la carcinogénèse pulmonaire associée à l'inflammation et interfère avec l'expression du COX-2, MMP-2 *in vitro* [\(Selvamani et al., 2012\)](#). L'Astragaline atténue l'inflammation induite par le LPS chez les souris, en abaissant l'activation de la voie de signal induite par le NF kB [\(Chen et al., 2012\)](#). Le Norkurarinol inhibe la réplication du rotavirus à travers une suppression du NF kB

et de l'AP-1 (Lee *et al.*, 2012). La Nano-quercétin a été utilisée pour minimiser les dommages sur les mitochondries et pour une sur-régulation du MMP-9 durant la prévention de l'inflammation gastrique induite par l'éthanol chez les rats (Stalin *et al.*, 2012). Le Quince module l'inflammation induite par les LPS dans les macrophages humains THP-1 à travers une inhibition du NF κ B, du p38MAPK et de l'Akt (Refai *et al.*, 2012).

I.2.2 Le stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme étant un déséquilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants, en faveur des pro-oxydants. L'Hespéridine allège la toxicité induite par l'acétaminophène chez des rats wistar par une abrogation du stress oxydant et de l'inflammation (Arjumand *et al.*, 2012). Le Pycnogenol module l'apoptose en supprimant le stress oxydant dans des cellules rénales traitées par du glucose (Kim *et al.*, 2011). Les flavonoïdes de *Inula britannica* réduisent le stress oxydant à travers une inhibition de l'expression et de la phosphorylation du p47 (phox) dans des cellules musculaires en culture (Wen *et al.*, 2011). L'Isopedicin, un composé bioactif de la plante médicinale chinoise *Fissistigma oldhamii*, inhibe la production de l'anion superoxyde dans des neutrophiles humains activés (Drent *et al.*, 2011) (Sia *et al.*, 2011). La génisteine (isoflavone) rétablit l'état oxydatif et inflammatoire de souris diabétiques (Franchi *et al.*, 2011).

I.2.3 La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative incurable du tissu cérébral qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales et notamment de la mémoire (Youdim *et Joseph*, 2001). C'est la forme la plus fréquente de démence chez l'être humain (Figure 5). Les causes exactes de la maladie d'Alzheimer restent encore inconnues. Les premiers symptômes sont souvent les pertes de souvenirs (amnésie), se manifestant initialement par des distractions mineures (Wattanapenpaiboon *et Wahlqvist*, 2003). Sur le plan structural il y a une accumulation des plaques d'amyloïdes qui correspondent à une accumulation extracellulaire d'un peptide appelé « β -amyloïde » ou « peptide A β 42 » (constitué de 42 acides aminés) (Mandel *et al.*, 2004). Cette protéine est une forme clivée anormale d'une glycoprotéine membranaire appelée « protéine précurseur de la protéine β -amyloïde » (APP pour *Amyloid Protein Precursor*) (Guidotti *et al.*, 2011). C'est une enzyme, la β -sécrétase, qui provoque, pour des raisons encore mal comprises, le clivage anormal de la protéine APP (Zilmer *et al.*, 2007). En temps normal cette protéine de la membrane des neurones est clivée par des sécrétases en peptide p. 3 non toxique. Le peptide A β 42

est un peptide insoluble qui ne peut être dégradé efficacement par les cellules environnantes. Il s'accumule dans le milieu extracellulaire, formant des plaques séniles qui compriment les neurones (Ramassamy, 2006). Le peptide β -amyloïde est donc une protéine neurotoxique.

La Neuroinflammation a été reconnue comme jouant un rôle critique dans la maladie d'Alzheimer, qui est caractérisée par une accumulation des plaques contenant des microglies activées et des peptides d'amyloïde β ($A\beta$) (Lim *et al.*, 2005). L'amyloïde β -42 joue un rôle plus important dans la pathogénicité de la maladie d'Alzheimer par rapport à l'amyloïde β 40 à cause de sa grande capacité d'agrégation et de sa neurotoxicité. En plus, il y a de plus en plus d'évidences indiquant que l'assemblage et l'accumulation de l'amyloïde β induit un dysfonctionnement de la fonction cognitive et un dysfonctionnement des synapses pendant la progression de la maladie (Pasinetti, 2012). L'effet bénéfique des composés contenus dans les aliments et végétaux tels que les polyphénols, les caroténoïdes et les antioxydants a été démontré dans plusieurs études (Stab *et al.*, 2012). Plusieurs auteurs ont investigué l'effet inhibiteur d'une variété de flavonoïdes sur l'agrégation de l'amyloïde β et la neurotoxicité. En particulier, la curcumine a présenté une activité prometteuse contre la maladie d'Alzheimer chez les souris transgéniques et a été récemment utilisé dans une étude clinique impliquant des patients humains souffrant de la maladie d'Alzheimer (Xie *et al.*, 2013).

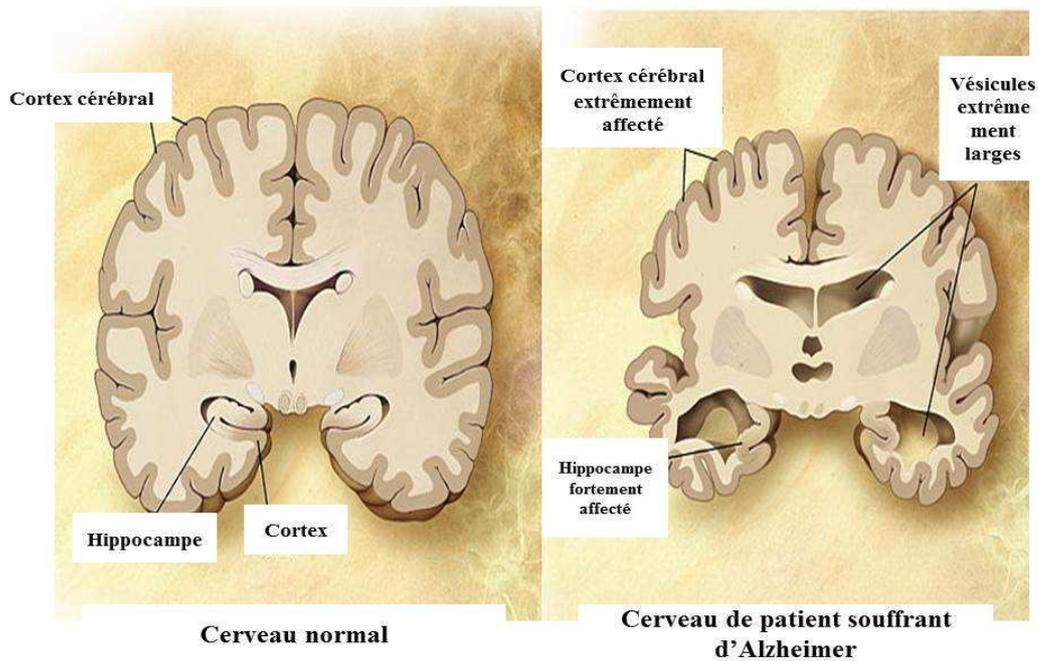


Figure 5: Représentation de cerveau normal (à gauche) et cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer (à droite) (Zhao *et al.*, 2012).

La maladie est considérée comme la sixième cause de mortalité dans toutes les tranches d'âges et la cinquième parmi les individus âgés de 65 ans et plus (Miniño, 2010; Wimo *et al.*, 2003). La maladie d'Alzheimer (AD) est une maladie multifactorielle caractérisée par une perte progressive de la mémoire, des troubles neuropsychiatriques et des troubles du comportement. On note également la présence de plaques d'amyloïdes β dans le cerveau, les artérioles, des NFTs (neurofibrillary tangles) intracellulaires, une perte de la population des neurones, ainsi qu'une prolifération et une activation des astrocytes et des microglies (Mattson, 2004; Reddy *et al.*, 2010; Selkoe, 2001). Selon les théories actuelles, l'accumulation de l'A β et l'hyperphosphorylation de la protéine tau sont les principaux facteurs responsables de la maladie (Hardy et Allsop, 1991; Selkoe, 2000). Une accumulation excessive d'A β , résultant soit d'une augmentation de la production, soit d'un déficit d'élimination entraîne une formation de plaques seniles (SPs) (Selkoe, 2000). Par la suite, une série d'évènements biologiques se mettent en place qui se terminent par

une atteinte des synapses neuronales à travers le stress oxydatif et la réponse inflammatoire (Heneka et O'Banion, 2007; Roberson et Mucke, 2006). Les NFTs sont des protéines tau anormalement hyperphosphorylées, qui contribuent considérablement à la perte de mémoire et à la progression de la maladie (Iqbal et al., 2009). Le dysfonctionnement des mitochondries est un événement supplémentaire qui contribue au déficit de mémoire et à l'endommagement des synapses (Manczak et al., 2006; Manczak et al., 2010; Reddy et al., 2010; Reddy et al., 2004; Zhao et al., 2010). L'activation et la prolifération des cellules gliales du cerveau telles que les astrocytes et les microglies aggravent la pathologie à travers la production de cytokines pro-inflammatoires et des toxines liées au processus de neurodégénération (McGeer et McGeer, 2002). La barrière sang-cerveau (blood-brain barrier) est ainsi rompue suite à l'accumulation des plaques d'A β dans les vaisseaux causant une cascade de réponses immunitaires et de dommages dans le cerveau (Sardi et al., 2011).

Considérant les effets néfastes sur le plan financier et social des maladies neurodégénératives, le développement des médicaments contre l'AD est une urgence et plusieurs modèles de souris transgéniques ont été établis à cet effet. Dans ces modèles, plusieurs composés et autres stratégies thérapeutiques ont été étudiés avec des résultats satisfaisants.

I.2.3.1. Principaux modèles de souris transgéniques pour la maladie d'Alzheimer

Plus de 95% des caractéristiques de l'AD apparaissent après l'âge de 65 ans (AD sporadique) tandis que moins de 5% des cas apparaissent précocement (appelé AD familial) (Beach, 2008). La recherche actuelle sur la maladie se focalise principalement sur la forme tardive. Deux raisons peuvent être mentionnées pour ceci. Premièrement, l'AD sporadique représente entièrement la théorie de l'amyloïde β qui est la plus connue et la plus acceptée décrivant les mécanismes moléculaires de l'AD (Hardy et Allsop, 1991). De plus, des modèles transgéniques de souris peuvent être générés pour décrire la maladie. Ainsi, de nos jours, trois gènes ont été décrits comme étant impliqués dans la maladie à savoir: la protéine précurseur d' amyloïde (APP), la préséniline 1 (PS1) et la préséniline 2 (PS2) (Bertram et Tanzi, 2012). Leurs variations sont responsables de l'accumulation d'A β (Bertram et al., 2010; Citron et al., 1997a; Scheuner et al., 1996). Ces

modèles de souris sont capables de récapituler les principales caractéristiques de la maladie tel qu'elle se déroule chez les humains (Chin, 2011). Cependant, à cause de la complexité de la maladie, il est difficile de créer des souris transgéniques qui expriment toutes les caractéristiques de la maladie. De ce fait, chaque modèle produit représente seulement certaines caractéristiques pathologiques, physiologiques et comportementales de la maladie (Chin, 2011).

I.2.3.1.1. Souris transgéniques contenant des mutations au niveau de l'APP

Comme mentionné au paragraphe précédent, l'hypothèse de l'amyloïde stipule que la production excessive d'A β est la principale cause de l'AD (Hardy et Allsop, 1991). Les souris transgéniques exprimant des mutations au niveau de l'APP sont largement utilisées pour l'évaluation des médicaments.

I.2.3.1.1. a Les souris transgéniques PD-APP

Les souris transgéniques PD-APP sont le premier modèle de souris transgéniques décrit arborant les séquences APP695swe et APP717V-F humaines (Games *et al.*, 1995). Plusieurs interventions thérapeutiques et expérimentales telles que l'immunothérapie, la modulation épigénétique et autres ont été réalisées en utilisant ces souris.

Chez les souris transgéniques PD-APP, les changements neuropathologiques augmentent avec l'âge. Il n'y a pas de changement pathologique majeur avant l'âge de 6 mois. À l'âge de 6-9 mois, les animaux commencent à présenter des dépôts d'A β dans l'hippocampe et le cortex cérébral (Games *et al.*, 1995).

I.2.3.1.1. b Les souris transgéniques Tg2576

Les souris Tg2576 possèdent une double mutation KM670/671NL (Hsiao *et al.*, 1996). Ce modèle est le plus utilisé pour des investigations précliniques en comparaison aux souris PD-APP. Une augmentation de la production d'A β est notée à l'âge de 2 mois. L'A β s'accumule avec l'âge et un excès d'A β peut être détecté entre 4-5 mois. Les plaques d'amyloïde se déposent graduellement dans les lobes frontales et temporales, le cortex, l'hippocampe et le cervelet (Kawarabayashi

et al., 2001). Aussitôt que les dépôts d' A β s' accumulent dans l' hippocampe et que le nombre de cellules microgliales s'accroît, les déficits de mémoire apparaissent; ceci autour de l' âge de 9 mois.

I.2.3.1.1. c Les souris transgéniques *TgCRND8*

Les souris TgCRND8 sont des souris mutantes contenant à la fois les séquences KM670/671/NL (Swedish mutation) et APP717V-F (Indiana mutation) (*Chishti et al., 2001; Janus et al., 2000b*). Ce modèle est une combinaison des modèles PDAPP et Tg2576 sous la régulation du Syrian hamster prion promoter (*Janus et al., 2000b*). Le niveau d'APP chez les souris TgCRND8 est 5 fois plus élevé que chez les souris non transgéniques témoins (*Chishti et al., 2001*). Les A β ₄₀ et A β ₄₂ humains peuvent être détectés dans les cerveaux de ces souris après 10 semaines d' âge.

I.2.3.1.1.d Les souris transgéniques *APP23*

Les souris APP23 expriment l' APP751 humaine portant la double mutation (K670M/N671L) sous la régulation du promoteur Thy-1 (*Sturchler-Pierrat et al., 1997*). Les premiers dépôts d' APP apparaissent après 6 mois d' âge. Leur nombre accroît en taille et en nombre si bien que après 24 mois, une partie importante du néocortex et de l' hippocampe est recouverte par des dépôts d' APP (*Sturchler-Pierrat et al., 1997*).

I.2.3.1.2. Souris transgéniques contenant des mutations au niveau de la Préséniline

La préséniline (PS) est un groupe de protéines transmembranaires impliquées dans la pathologie de l'AD et qui fonctionnent comme une partie de l'enzyme γ -secretase (*Sherrington et al., 1995*). Les PS1 et PS2 sont deux gènes liés dont les mutations sont impliquées dans les premiers signes de l'AD (*Ertekin-Taner, 2007*).

I.2.3.1.2.a. Souris transgéniques contenant des mutations au niveau de la PS et de l'APP

Contrairement aux souris transgéniques APP, ces modèles révèlent une perte neuronale plus accentuée (*Irizarry et al., 1997a; Irizarry et al., 1997b*). Ces souris peuvent exprimer des dépôts

de plaques plus précoces (Elder *et al.*, 2010b). Ainsi, les souris produites sont fréquemment utilisées en études précliniques.

I.2.3.1.2.b. Les souris transgéniques APPPS1

Plusieurs souris transgéniques APP/PS1 ont été produites de la manière suivante: Les souris APP/PS1 exprimant à la fois la forme mutante humaine APP (K670N/M671L) et PS1 (M146L) (Holcomb *et al.*, 1998), les souris exprimant la forme mutante humaine APP751 (KM670/671NL et V717I) et PS1 (M146L) (Schmitz *et al.*, 2004), les souris exprimant les formes mutantes humaine de l' APP (K670N/M671L + V717I) et PS1 (M233T/L235P) (Casas *et al.*, 2004). Le plus grand avantage de ce modèle est que ces souris présentent un dépôt d' amyloïde β relativement rapide, pouvant être détecté aussi bien dans le cortex que dans l' hippocampe. L' accumulation d' $A\beta$ s' accélère avec le vieillissement (Holcomb *et al.*, 1998), et le rapport $A\beta_{42}/ A\beta_{40}$ accroit (Borchelt *et al.*, 1996; Oakley *et al.*, 2006).

I.2.3.2. Développement des médicaments pour le traitement de la maladie d'Alzheimer

Considérant les dépenses sur le plan financier et les effets sur le plan social des maladies neurodégénératives, le développement des médicaments contre l' AD est une urgence. Plusieurs substances issues de différentes sources ont été analysées dans des études précliniques et cliniques pour le traitement de l'AD. Ces substances impliquent, non seulement les médicaments approuvés par la FDA (US Food and Drug Administration) tels que la Tacrine, la Rivastigmine, la Galantamine et la Donepezil, mais aussi plusieurs autres types de médicaments de diverses catégories tels que les inhibiteurs de cholinestérase (ChEIs), les récepteurs de l'acide N-méthyl-d-aspartique (NMDA), les anti-oxidants, les inhibiteurs de kinases et les immunorégulateurs.

I.2.3.2. 1 Les inhibiteurs de Cholinestérase (ChEIs)

Les inhibiteurs de cholinestérase sont des agents approuvés par la FDA pour le traitement de l' AD et les premières options utilisées contre les formes modérées d' AD (DeLaGarza, 2003). Le

système cholinergique localisé dans le cerveau est impliqué dans l'apprentissage et la mémoire. Une perte des neurones cholinergiques et des déficits du système cholinergique sont évidents chez les patients d'AD; ainsi qu'une diminution des niveaux d'acétylcholine dans les synapses. Par conséquent, l'inhibition des enzymes responsables de la dégradation d'acétylcholine est une stratégie thérapeutique pour augmenter la concentration d'acétylcholine, améliorant ainsi la transmission neuronale, diminuant la génération d'A β , et diminuant les déficits de mémoire.

Néanmoins, les inhibiteurs de cholinestérase ne possèdent pas d'effets neuroprotecteurs significatifs et retardent simplement le développement de la maladie (Massoud et Leger, 2011).

I.2.3.2. 2 Les antagonistes au récepteur NMDA

Le glutamate est le principal neurotransmetteur dans le système nerveux central, et une activation excessive des récepteurs NMDA du glutamate joue un rôle majeur dans la neurotoxicité, la mémoire et l'apprentissage (Scholtzova *et al.*, 2008). Ainsi, bloquer la voie de signal NMDA pourrait avoir un effet significatif dans le traitement de l'AD. Un exemple de médicament utilisé dans ce groupe est la Mémantine (van Marum, 2009).

I.2.3.2. 3 Les modulateurs de la voie de l'A β

L'A β est généré après un clivage séquentiel de l'APP par deux différentes protéases, les β - et γ -sécrétases. L'APP est clivé par la β -sécrétase et la beta-site APP cleaving enzyme-1 (BACE1), pour produire le sAPP β qui est sécrété et un fragment C99. Ensuite, le C99 est clivé par la γ -sécrétase, qui produit les A β_{40} et A β_{42} (Selkoe, 1998; Velliquette *et al.*, 2005). Ces deux protéases sont des agents attractifs pour le développement des médicaments.

I.2.3.2. 3.a Les inhibiteurs de γ -sécrétase

La γ -Sécrétase est une protéase contenant quatre protéines membranaires avec la préséniline-1 (PS1) ou la préséniline -2 (PS2) comme composante catalytique (Wolfe, 2006). Les inhibiteurs de γ -Sécrétase (GSIs), tels que le CHF5074 et le DAPT inhibent fortement la production d'A β en

modulant le site de préférence pour le clivage de la γ -secretase. Ils abaissent la production d' $A\beta_{42}$, et accroissent la production des peptides $A\beta$ plus solubles et moins toxiques (Weggen *et al.*, 2001).

I.2.3.2. 3 .b Les inhibiteurs de β -secretase

L' activité de la BACE1 dans le clivage de l' APP est l' étape initiatrice dans la formation de l' $A\beta$. La BACE1 est une protéine transmembranaire de type I (Kandalepas et Vassar, 2012). L' activité de la β -secretase pourrait être augmentée par induction de la BACE1, entraînant une augmentation des produits du clivage de la β -secretase clivage tels que la sAPP β et la C99, ainsi que l' augmentation de la production d' $A\beta$ (Cole et Vassar, 2007). Les inhibiteurs de la BACE1 traversent la barrière sang-cerveau et les membranes des neurones (Fukumoto *et al.*, 2010).

Cependant, les inhibiteurs de β -secretase les plus actifs tels que la GRL-8234 et le Bis (7)-Cognitin ont de mauvaises propriétés pharmaceutiques et pharmacocinétiques et ces composés sont considérés comme peu prometteurs pour le traitement de la maladie (Ghosh *et al.*, 2012).

I.2.3.2. 3 .c Les inhibiteurs de Kinase

La phosphorylation du Tau et l'assemblage des microtubules impliquées dans la pathologie de l'AD sont régulés par des kinases (Kosik *et al.*, 1986). La Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) est la principale protéine kinase tau qui médie la neurotoxicité de l' $A\beta$ dans l'AD (Medina et Avila, 2010). Cibler la GSK-3 est ainsi une approche attractive pour le développement des médicaments (Gao *et al.*, 2012). Les inhibiteurs de GSK3 β tels que le diosmin, la luteolin sont spécialement attractifs, étant donné qu'ils ne réduisent pas seulement la formation des NFTs, mais aussi diminuent la formation et le dépôt de l' $A\beta$ (Medina et Avila, 2010). Le Cdk5 (Cyclin-dependent kinase 5), le JNK et le MARK (microtubule-associated regulatory kinase) et d' autres kinases impliquées dans la pathologie du tau sont aussi considérés comme cibles potentielles pour le traitement de la maladie (Brunden *et al.*, 2009; Dolan et Johnson, 2010).

I.2.4 Modèles utilisés pour les études concernant la maladie d'Alzheimer

Un des prérequis pour la thérapie de la maladie d'Alzheimer est la démonstration de l'efficacité des composés utilisés dans les études précliniques ou les modèles animaux *in vivo*. Les souris transgéniques sont l'un des modèles plus fréquemment utilisés pour mimer la maladie d'Alzheimer chez les humains (Pacheco-Herrero *et al.*, 2013). Ces souris transgéniques sur-expriment la forme humaine de la protéine précurseur d'amyloïde β . Elles expriment une accumulation et un dépôt des plaques extracellulaires du peptide d'amyloïde β dans le cerveau en fonction de l'âge, détectant ainsi l'une des pathologies clé observées dans les cerveaux des patients souffrant d'Alzheimer (Puig *et al.*, 2013). Bien que ces modèles ne récapitulent pas tous les dysfonctionnements caractérisant la maladie d'Alzheimer, ils sont de nos jours incontournables pour le développement des médicaments dont le but est de diminuer la production d'amyloïde β , d'inhiber son dépôt ou de faciliter son élimination. Le développement de ces modèles de souris transgéniques APP a permis l'incorporation des gènes humains mutant de la préséniline, permettant un dépôt accéléré d'amyloïde β et de la protéine tau (Zhao *et al.*, 2012).

I.2.5 Polyphénols et maladies neuroinflammatoires

Les polyphénols semblent être des agents thérapeutiques prometteurs pour le traitement de plusieurs maladies neurodégénératives. La Luteolin réduit la mort des neurones de l'hippocampe induite par la neuroinflammation, en réduisant la mort des neurones (Bi *et al.*, 2011). Les isoflavones du soja abaissent l'inflammation induite par le β amyloïde 1-42 permettant ainsi d'améliorer les fonctions de la mémoire en abaissant la régulation de l'expression du TLR4 et du NF κ B chez les rats (Ma *et al.*, 2011). Le naringenin, flavone du citron inhibe le signal inflammatoire dans les cellules gliales et protège contre les dommages neuroinflammatoires (Vauzour *et al.*, 2009). La Luteolin protège les neurones dopaminergiques contre l'inflammation à travers une inhibition de l'activation des microglies (Jin *et al.*, 2008).

I.2.6 Le Diabète

La réponse inflammatoire chez les sujets diabétiques contribue également à la complication du diabète. Plusieurs polyphénols sont utilisés dans le traitement contre les dommages causés par l'inflammation au cours de cette maladie. La Puerarin atténue la résistance des cellules de l'endothélium à l'insuline à travers une inhibition de l'IKKbeta/IRS-1 (Liu *et al.*, 2012). Les effets bénéfiques des polyphénols du citron et la supplémentation de l'alimentation des chats obèses par

une alimentation riche en curcumine améliore le statu inflammatoire chez ces animaux (Freuchet *et al.*, 2011). La Génisteine atténue l'inflammation de la rétine causée par le diabète en ciblant l'activation des microglies (El-Shishtawy *et al.*, 2010).

I.2.7 L'asthme

L'inflammation joue également un rôle primordial dans l'accentuation des complications de l'asthme. Ces complications peuvent cependant être atténuées par plusieurs polyphénols. La Chrysin atténue l'inflammation lors de l'allergie en modulant les facteurs de transcription T-bet et GATA-3 chez les souris (Gu *et al.*, 2012). La Fisetin, un flavonol bioactif, atténue l'inflammation lors de la réaction allergique à travers une régulation négative du NF- κ B (Upton *et al.*, 2012).

I.3 La Baicaline

La baicaline est un flavonoïde isolé de la plante médicinale chinoise Huang-chin (*Scutellaria baicalensis*) et l'un des ingrédients chimiques de Sho-Saiko-To, qui est un supplément alimentaire. La baicaline est un dépuratif hépatique réputé en médecine traditionnelle chinoise.

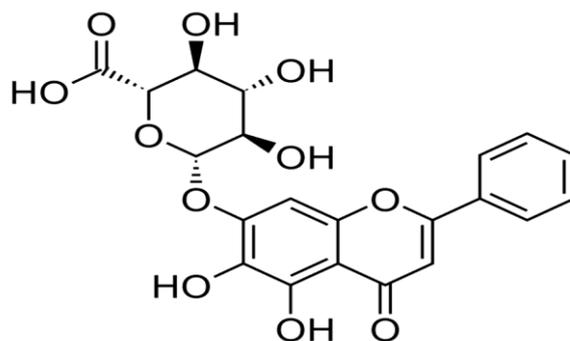


Figure 6: Structure de la Baicaline (Zhu *et al.*, 2012)

Plusieurs travaux ont été menés de nos jours pour démontrer les propriétés de la baicaline. La baicaline possède des activités antioxydantes à travers une élimination de l'anion superoxyde (Liu *et al.*, 2000). Le Flavocoxide, un mélange d'extrait contenant la baicaline et les catéchines agit comme inhibiteur des enzymes cyclooxygénase (COX) et 5-lipoxygénase (LOX) (Squadrito *et al.*, 2009). La baicaline inhibe également la production de Prostaglandines E2 par les macrophages traités par les LPS (Chiba *et al.*, 2009). Des expériences *in vitro* ont montré que la baicaline supprime la production excessive d'oxyde nitrique (NO) et l'expression de l'inducible nitric oxide synthase (iNOS) induite par les LPS ou par l'interféron-gamma (IFN-gamma) chez les macrophages Raw 264.7 et les macrophages péritonéaux. En plus, la même étude a montré que la baicaline inhibe la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS), tandis qu'il augmente le niveau intracellulaire de superoxyde dismutase (SOD) (Gong *et al.*, 2008). La baicaline régule les Toll-like receptors 2 et 4 après une infection des neurones et les dommages causés par l'inflammation sur les neurones (Yuan *et al.*, 2012). La baicaline améliore la survie dans un modèle de souris infectées par des microbes et l'apoptose des lymphocytes (Wang *et al.*, 2012). La baicaline atténue l'inflammation en inhibant l'activation du NF- κ B (Jingcheng *et al.*, 2010). Plusieurs études *in vitro* ont montré que la baicaline supprime l'accroissement de la production d'oxyde nitrique et de l'iNOS (Gong *et al.*, 2008).

I.4 *Entada africana* (Fabaceae)

Entada africana est une plante utilisée en médecine traditionnelle Africaine contre une multitude de maladies. La plante est utilisée pour traiter les maux d'estomac, les blessures, la fièvre, les maladies du foie, des éruptions de la peau, le rhumatisme, la cataracte, et la dysenterie. Les études menées avec *Entada africana* concernent ses activités antimicrobiennes, antiplasmodiales et antioxydantes (Tchacondo *et al.*, 2011), les activités antiprolifératives (Dal Piaz *et al.*, 2006), activité de fixation du complément (Paulsen *et al.*, 2001), activités fongicides et fongistatiques (Okemo *et al.*, 1996), et les activités anti-ulcérogéniques (Obidike et Emeje, 2011). Les effets d'*E. africana* sur l'inflammation par les macrophages Raw 264.7 n'ont pas encore été étudiés.



Figure 7: Photographie d'*Entada africana* (Fabaceae) (Owona, 2012)

I.5 *Khaya grandifoliola* (Méliaceae)

Khaya grandifoliola est un arbre de la famille des Méliacées qui est communément utilisé par les tradipraticiens de l’Afrique centrale et de l’Ouest dans le traitement du paludisme, des hépatites, de la fièvre et des blessures. L’extrait brut provenant de l’écorce et des grains de *Khaya grandifoliola* a présenté des effets positifs *in vitro* contre le *Plasmodium falciparum* avec une IC₅₀ de 13.23 µg/ml (Njifutie *et al.*, 2000). De cet extrait a été isolé sept limonoïdes parmi lesquels le methylangolensate (1), le 6-methylhydroxyangolensate (2), la gedunin (3), le 7-deacetylkhivorin (5), le 1-deacetylkhivorin (6), le swietenolide (7), le 6-acetylswietenolide (8) et un flavonoïde, la catéchine (4). Le limonoïde le plus actif (gedunin), a présenté un effet additif lorsqu’il est combiné avec la chloroquine (Njifutie *et al.*, 2000). *K. grandifoliola* possède également des composés efficaces dans l’élimination des mollusques (Makanga et Odyek, 1989). La présence de polyphénols en grande majorité a été confirmée dans cette plante (Oladeinde *et al.*, 2008). Cependant, les effets anti-inflammatoires de *K. grandifoliola* dans la régulation de l’inflammation et des maladies liées à l’inflammation par les cellules immunitaires n’ont pas encore été rapportés.



Figure 8: Aperçu du tronc d’arbre de *Khaya grandifoliola* (Meliaceae) (Owona, 2012)

CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES

II- MATERIEL ET METHODES

II- 1. MATERIEL

II-1-1. MATERIEL VEGETAL

Les écorces de *Khaya grandifoliola* (Méliaceae, Voucher number 23434YA) et d'*Entada africana* (Fabaceae, Voucher number 52661YA) ont été récoltées à Fouban (Ouest Cameroun) au mois de Juillet 2010, puis séchées à température ambiante et à l'ombre au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I. Elles ont été par la suite découpées et finement broyées, et la poudre obtenue a été utilisée pour la préparation des extraits au chlorure de méthylène/ méthanol. La Baicaline (99%) a été achetée à Carbosynth Ltd. (Compton, Berkshire, UK).

II-1-2. ANIMAUX D'EXPERIENCE ET LIGNEES CELLULAIRES

Les macrophages RAW 264.7 et les microglies N9 ont été utilisés dans ce travail. Les extraits de plantes ont été dissous dans du DMSO à une concentration finale de 0.01% dans la solution de culture cellulaire.

Les souris APP ont été utilisées pour tester l'activité de nouveaux traitements visant à réduire les dépôts de peptides A β . Ces souris sont caractérisées par des dépôts extracellulaires et des accumulations intracellulaires de peptides A β sous forme de granules qui sont observées dès l'âge de 3 mois. Les souris APP/PS1-21 avec un profil C57BL/6J ont été obtenues du Prof. M. Jucker. Les souris males hétérozygotes APP/PS1-21 ont été élevées avec des souris femelles de souche sauvage C57BL/6J (Charles River Germany, Sulzfeld Germany). Les queues des souris issues de ce croisement ont été brièvement sectionnées et le génotypage a été réalisé en utilisant une PCR avec les amorces spécifiques pour la séquence d'APP- (sens: GAATTCCGACATGACTCAGG, antisens: GTTCTGCTGCATCTTGGACA). Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec la loi Allemande sur le traitement des animaux (TierSchG) de 2006.

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

II-1-3. REACTIFS

Tous les réactifs utilisés au cours de ce travail sont de grade supérieur. Leur mode de préparation est résumé en annexe.

II-2. METHODES

II-2-1. Préparation des extraits au CH₂Cl₂/MeOH 1:1 V/V de *Khaya grandifoliola* et d'*Entada africana* et obtention des fractions par chromatographie flash

Un kg de poudre de chaque plante a été introduit dans 1 litre du mélange CH₂Cl₂/MeOH 1 :1 V/V à température ambiante et pendant 7 jours plusieurs fois jusqu'à épuisement. Le filtrat obtenu a été utilisé pour la préparation des différents extraits bruts tel que schématisé par la Figure 9 ci-dessous.

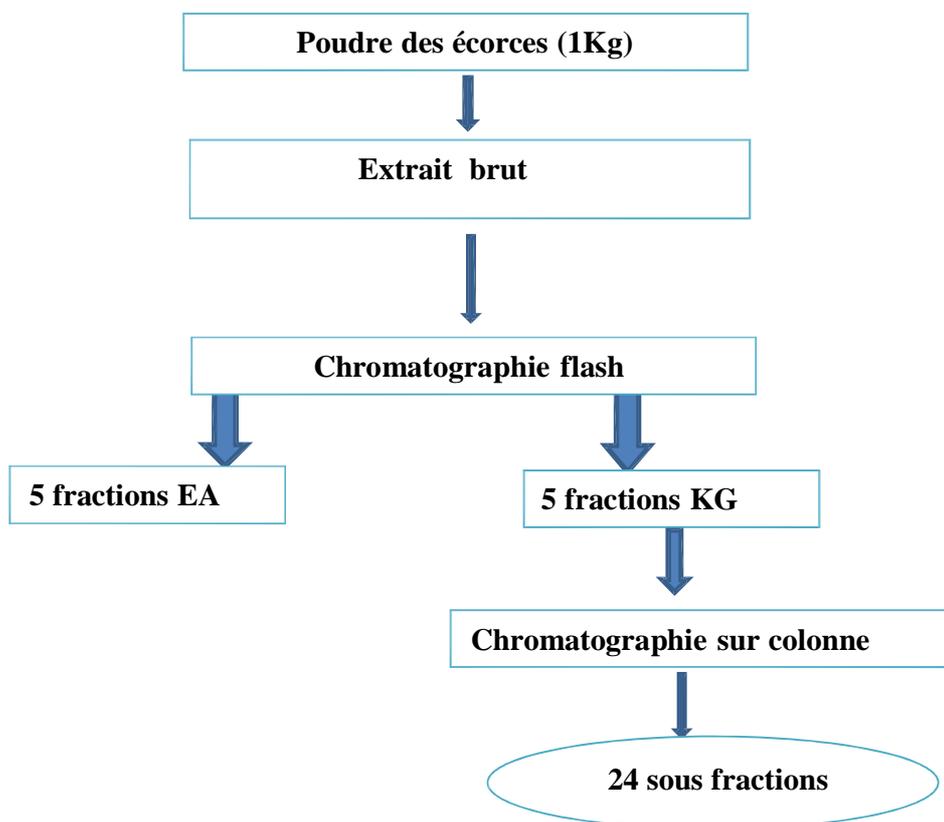


Figure 9: Schéma d'extraction et préparation des fractions et sous fractions de *K. grandifoliola* et d'*E. africana*

II.2.1.1 Extraction par chromatographie flash (Kang *et al.*, 2015)

Mode opératoire

L'extrait brut de chaque plante (31,80g) a été dissous dans du méthanol à l'intérieur d'un ballon. Ensuite, la poudre de silice (31,80g) et du méthanol ont été ajoutés, puis, l'ensemble a été homogénéisé par agitation. Le mélange obtenu a été concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif. La pâte obtenue a été séchée, écrasée et fractionnée en utilisant le dispositif présenté sur la figure 10 ci-dessous.

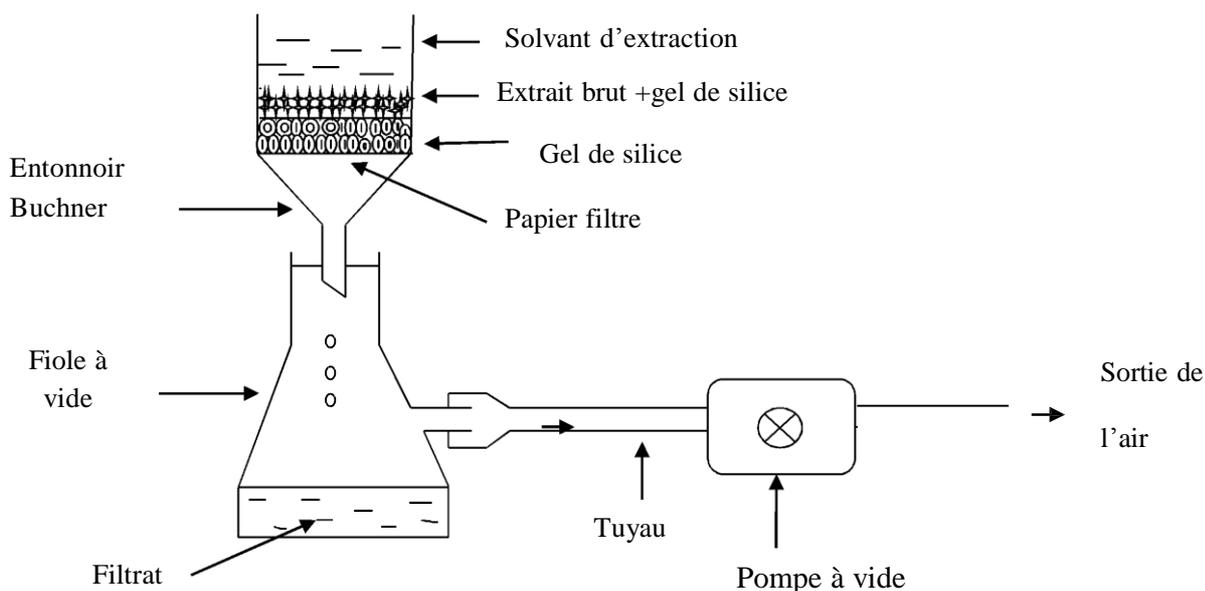


Figure 10: Montage de la chromatographie flash

Après la chromatographie sur couche mince dont le but a été de retrouver le système solvant qui sépare le mieux les constituants des extraits bruts, les solvants et mélanges de solvants suivants ont été utilisés: chlorure de méthylène, chlorure de méthylène / méthanol (95 : 5 v/v), chlorure de méthylène / méthanol (90 : 10 v/v), chlorure de méthylène / méthanol (75 : 25 v/v) et méthanol. Les différents filtrats obtenus avec un même solvant ont été mélangés puis concentrés à l'évaporateur rotatif. Le résidu obtenu formant une fraction a été pesé, le rendement calculé puis, conservé à 4°C jusqu'à utilisation. Les extraits obtenus ont été par la suite testés.

II.2.2 Fractionnement de l'extrait brut de *K. grandifoliola* par chromatographie sur colonne (Faraji et al., 2015)

Principe

La chromatographie sur colonne est une méthode utilisée pour purifier des composés individuels à partir d'un mélange de composés, reposant sur la séparation des molécules entre une phase stationnaire solide (gel de silice) et une phase mobile servant d'éluant sous l'effet de la gravité. Les composés sont séparés en fonction de leur plus ou moins grande affinité pour la phase stationnaire.

Mode opératoire

L'extrait brut (31,80g) a été dissous dans du méthanol à l'intérieur d'un ballon. Ensuite, la poudre de silice (31,80g) et du méthanol ont été ajoutés et l'ensemble homogénéisé par agitation. La silice a été utilisée pour la préparation de la phase stationnaire. Le mélange contenant l'extrait a été soigneusement déposé au-dessus de la phase stationnaire. L'éluant a été ensuite progressivement versé à travers la colonne pour faire migrer le matériel organique. Les composés individuels ont été différemment retenus par la phase stationnaire et séparés les uns des autres pendant qu'ils traversent la colonne à différentes vitesses après ajout de l'éluant. Durant le processus de chromatographie, l'éluant a été collecté en une série de fractions. La composition de chaque fraction a été analysée par chromatographie sur couche mince. Cette méthodologie nous a permis d'obtenir 24 sous fractions de *K. grandifoliola*, ces dernières ont toutes été testées dans la suite du travail.

II-2-3. Culture cellulaire (Zhang et al., 2010)

Les lignées cellulaires Raw 264.7 (macrophages) et N9 (microglies) ont été utilisées pour déterminer les effets de *K. grandifoliola* et *E. africana in vitro*. La culture cellulaire est faite dans les milieux RPMI ou DMEM contenant de la pénicilline (100U/ml) et 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules ont été cultivées à 37°C dans un incubateur sous une atmosphère de 5% CO₂ et 95% O₂.

II-2-4. Détermination de la viabilité cellulaire: Test au MTT (Wu *et al.*, 2012)

Principe

Le 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT) est un substrat de couleur jaune qui est réduit par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes pour former un produit formazan de couleur bleue. Ce processus requiert des mitochondries actives, et seules les cellules mortes ne peuvent significativement réduire le MTT. La DO du produit bleu obtenu est lue à 540 nm.

🚧 Mode opératoire

Les cellules (macrophages et ou microglies) ont été cultivées dans des plaques de culture cellulaire de 12 puits ($1 \cdot 10^5$ cellules/ml) et incubées pendant 24h. Après cette période d'incubation, les cellules ont été traitées avec différentes concentrations d'extraits de plantes (0.01 ; 0.1 ; 1 ; 10 et 100 μ g/ml) et avec du LPS (1 μ g/ml). Après traitement, 100 μ g/ml de MTT (5mg/ml) dissous dans du RPMI sont ajoutés dans chaque puits, suivi d'une incubation de 3h. Le milieu de culture a été ensuite aspiré, et les cristaux de formazan dissous dans 500 μ l de DMSO pendant 15 min. La densité optique de chaque puits a été ensuite mesurée à 540 nm au moyen d'un lecteur de plaque ELISA (MWG Biotech Kinetic microplate reader).

II-2-5. Mesure de la production de l'oxyde nitrique (NO) (Stone *et al.*, 2012)

Principe

Ce test repose sur la réaction de diazotation décrite pour la première fois en 1879 par Griess. La procédure est basée sur la réaction chimique représentée par la figure 11 ci-dessous, requérant le sulfanilamide et le naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED) sous des conditions acides. Le Sulfanilamide et le NED compétissent pour le nitrate dans la réaction de Griess.

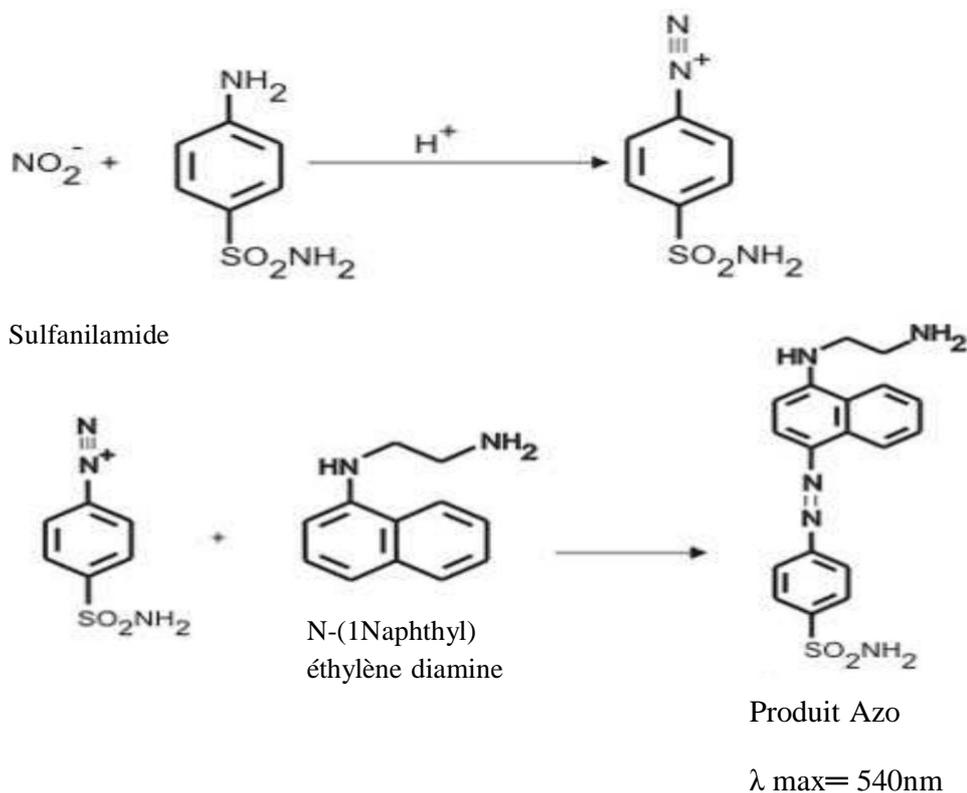


Figure 11: Principe du dosage de l'oxyde nitrique (Satai *et al.*, 1993)

🔧 Mode opératoire

La production de NO a été déterminée en mesurant le niveau d'accumulation de nitrite, un indicateur de NO dans le surnageant après 24h de traitement avec le LPS en présence ou en absence de différentes concentrations d'extrait de plantes, en utilisant une réaction colorimétrique avec le réactif de Griess. Après incubation des cellules (macrophages et ou microglies) (1.10^5 cellules/ml) pendant 24h, la baicalin ($5\mu\text{g/ml}$), les extraits de plantes (0.01 ; 0.1 ; 1 ; 10 et $100\mu\text{g/ml}$) ou les fractions (0.05 ; 0.5 ; 5 ; et $50\mu\text{g/ml}$) ont été ajoutés (ces concentrations sont les concentrations finales dans le milieu de culture), subséquemment avec le LPS ($1\mu\text{g/ml}$). Les cellules ont été ensuite incubées pendant 24h. La quantité de nitrite dans le milieu de culture cellulaire a été mesurée comme indicateur de la production de NO. Cette mesure se fait en utilisant le réactif de Griess (1% sulfanilamide et 0.1% naphthyl éthylène diamine dihydrochloride dans 2.5% d'acide phosphorique). Cent microlitres de milieu de culture cellulaire ont été mélangés à $100\mu\text{l}$ de réactif de Griess. Subséquemment, le mélange a été incubé à température ambiante pendant 10 min et

l'absorbance à 570 nm a été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA (MWG Biotech Kinetic microplate reader). La quantité de nitrite a été déterminée à partir d'une courbe standard de nitrate de sodium.

II-2-6. Production et mesure du H₂O₂ (espèces réactives de l'oxygène) intracellulaire (Overman *et al.*, 2010)

Principe

L'oxydation du 2'-7' dichlorofluorescein (H₂DCF) en 2'-7'dichlorofluorescein (DCF) est utilisée pour quantifier la production de H₂O₂. La forme di-acétate, H₂DCFDA et son ester acétométhyl H₂DCFDA-AM sont internalisés par les cellules dans lesquelles des estérases cellulaires non spécifiques agissent sur cette dernière pour cliver les groupes lipophiles, résultant en un composé chargé qui est retenu dans la cellule. L'oxydation du H₂DCF par les ROS converti la molécule en 2', 7' dichlorodihydrofluorescein (DCF), qui est hautement fluorescent. Les longueurs d'onde pour la mesure de la fluorescence du DCF sont 498 nm pour l'excitation et 522 nm pour l'émission.

Mode opératoire

Le niveau de production de ROS intracellulaire a été déterminé sur la base du changement de fluorescence résultant de l'oxydation de la sonde fluorescente H₂DCFDA. Les cellules (5.10⁵ cellules/ml) ont été incubées avec les extraits de plantes (0.05 ; 0.5 ; 5 ; et 50 µg/ml) et/ou la baicalin (5 µg/ml) pendant 30 min et ensuite avec le H₂DCFDA pendant 6h supplémentaires. Après une incubation finale avec le H₂DCFDA pendant 1h, la production de ROS intracellulaire a été déterminée par cytométrie de flux (FAC SCAN).

II-2-7 Mesure de l'activité phagocytaire (Pettit *et al.*, 2013)

Principe

Au cours de la réaction de phagocytose, les macrophages phagocytent le FITC-dextran et l'intensité du signal fluorescent émis, qui correspond directement au nombre de particules phagocytées, est mesurée par cytométrie de flux.

Mode opératoire

Les cellules ont été incubées dans des plaques de culture cellulaire de 24 puits, en présence ou en l'absence des extraits (0.05 ; 0.5 ; 5 ; et 50 µg/ml) ou de la baicalin (5 µg/ml) pendant 30 min. Ensuite, elles ont été incubées avec du FITC-Dextran (1mg/ml) pendant 30 min à 37°C. La réaction a été ensuite arrêtée par ajout de 4ml de PBS froid (4°C), et les cellules ont été ensuite lavées 4 fois avec du PBS. Après fixation des cellules avec du formaldéhyde 3.7% (300 µl/puits), l'activité phagocytaire a été mesurée par cytométrie de flux.

II-2-8 Préparation des ARNms totaux des cellules et mesure de l'expression des cytokines (Liu *et al.*, 2008)

II-2-8-1. Protocole expérimental

Les cellules (macrophages ou microglies) ont été introduites dans chaque puits à raison de 1ml de milieu pour 1.10^5 cellules. Elles ont été ensuite soit traitées par le DMSO (0.01%), soit par les extraits de plantes (0.05 ; 0.5 ; 5 et 50 µg/ml) ou la baicalin (5µg/ml) dans les puits. Les cellules traitées ont été ensuite incubées à 37°C sous atmosphère 5% CO₂, 95% O₂ pendant 24h. A l'issue de ce temps d'incubation, les cellules ont été collectées et les ARN totaux extraits.

II-2-8-2. Extraction des ARNs totaux

Les ARNs totaux des cellules ont été extraits en utilisant le kit innuPREP RNA Mini kit (Analytic Jena Biometra).

Le mode opératoire ci-dessous donne les différentes étapes de l'extraction des ARN des cellules.

Mode opératoire

Quatre cent μl de solution de lyse RL ont été ajoutés au culot de cellules. Les cellules ont été incubées pendant 2 min à température ambiante. Le culot de cellules a été complètement ré-suspendu en pipetant la solution à plusieurs reprises. Les échantillons ont été incubés pendant 3 min supplémentaires à température ambiante. Un tube de filtration D (couleur bleue) a été introduit dans un tube récepteur. L'échantillon lysé a été transféré dans le tube D. L'échantillon a été centrifugé à 12.000 rpm pendant 2 min. Le tube de filtration D a été ensuite éliminé. Un nouveau tube de filtration R (violet) a été introduit dans un nouveau tube récepteur de 2ml. Un volume de 400 μl d'éthanol 70% a été ajouté au filtrat de l'étape précédente. L'échantillon a été mélangé et transféré dans le tube filtre R. Le mélange a été centrifugé à 12.000 rpm pendant 2 min. Le tube récepteur de 2ml contenant le filtrat a été éliminé et le tube filtre R placé dans un nouveau tube récepteur de 2ml. Le tube filtre R a été ouvert et 500 μl de solution de lavage HS y ont été ajoutés. Le tube a été ensuite fermé, puis centrifugé à 12.000 rpm pendant 1min. Le tube récepteur contenant le filtrat a été ensuite éliminé. Le tube filtre R a été introduit dans un nouveau tube récepteur de 2ml. Le tube filtre R a été de nouveau ouvert et 700 μl de solution de lavage LS y ont été ajoutés, puis le tube a été immédiatement fermé et centrifugé à 12.000 rpm pendant 1min. Le tube récepteur contenant le filtrat a été de nouveau éliminé. Le tube filtre R a été introduit dans un nouveau tube récepteur de 2ml, puis centrifugé à 12.000 rpm pendant 3 min pour éliminer les traces d'éthanol. Le tube récepteur de 2ml a été ensuite éliminé. Le tube de filtration R a été placé dans un tube d'élution de 1.5 ml, puis ouvert avec précaution et 30 μl de « RNase-free water » y ont été enfin introduit. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 1min, puis centrifugé à 8000 rpm pendant 1min.

II-2-8-3. Détermination de la quantité et de la pureté des ARNs totaux (Li et al., 2012)

La concentration des ARNs des échantillons a été déterminée au spectrophotomètre (Eppendorf Biophotometer) par le rapport DO à 260 nm/ DO à 280 nm. Pour la lecture des densités optiques, 2 μl d'échantillon d'ARN ont été dilués au 50^{ème} avec de l'eau dépourvue de RNase et les rapports DO à 260 nm/ DO à 280 nm et DO à 260 nm/ DO à 230 nm ont été déterminés contre le blanc constitué d'eau « RNase free » (100 μl). Le rapport DO à 260 nm/ DO à 280 nm permet de vérifier

la pureté des ARN par rapport à leur contamination par les protéines qui absorbent à 280 nm. Une solution d'ARN est considérée comme pure lorsque ce rapport est voisin de 1.8. La concentration en ARN a été directement lue au spectrophotomètre.

II-2-8-4. RT- PCR des ARNms des cellules (macrophages et microglies) (Li et al., 2012)

Cette technique permet une rétrotranscription et une amplification de l'ADNc un grand nombre de fois.

Principe

En présence de la transcriptase reverse (Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase: MMLV-RT), l'ensemble des ARN poly (A) est transcrit en ADN complémentaire (ADNc). L'initiation de la transcription et la sélection des messagers se font à l'aide d'une amorce oligo dT s'hybridant à la queue poly (A) de ses messagers.

Mode opératoire

Tableau 6: Préparation de la solution d'amplification pour RT-PCR

Produits	Volume pour 1 tube (µl)
RNA (µl)	En fonction de la quantité de RNA obtenue en µg/ml
Random primer	1
dH₂O	En fonction de la quantité de RNA obtenue en µg/ml
Volume total par tube : 15 ml	

Legende : Ce tableau décrit la préparation de la solution d'amplification pour la réaction de RT-PCR.

Les tubes contenant les différentes solutions ont été introduits dans l'appareil de PCR pendant 5 min à 70°C.

Tableau 7: Préparation des tubes pour PCR

Produits	Volume pour 1 tube (µl)	Volume pour 8 tubes (µl)
Tampon	5	40
dNTP	2.5	20
RNAse inhibitor (40µg/ml)	0.6	4.8
RT (200U))	1	8
H₂O	0.9	7.2

Legende : Ce tableau décrit la préparation des tubes pour la réaction de polymérisation en chaîne.

Les différents réactifs ont été introduits dans des tubes (10µl pour chaque tube), puis mélangés au vortex et introduits dans l'appareil de PCR (Flex cycler, Analytik Jena). La réaction a eu lieu à 37°C pendant 1h (synthèse de l'ADNc) puis à 94°C pendant 2 min (dénaturation de la transcriptase reverse). Les ADNc ont été conservés à - 20°C ou directement utilisés pour l'amplification en chaîne (PCR).

II-2-8-5. PCR des ADNs complémentaires

Principe

Cette méthode permet l'amplification d'un brin d'ADN par l'action d'une polymérase, la Taq polymérase. La réaction est subdivisée en trois principales étapes :

Dénaturation : séparation des brins d'ADN à 95°C.

Hybridation : fixation des amorces spécifiques au gène d'intérêt à leur région complémentaire sur chaque brin d'ADN à 60°C.

Polymérisation : synthèse à partir de chaque amorce d'un nouveau brin d'ADN en utilisant le brin complémentaire comme matrice à 72°C.

Les gènes de la β -actin et la GADPH, dont les expressions sont constantes dans les macrophages et les microglies sont utilisés comme gènes témoins.

Tableau 8: Amorces utilisées (Kole *et al.*, 2011)

Gene	Primer sequences
TNFα	F 5'-TTGACCTCAGCGCTGAGTTG-3' R 5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'
IL-1β	F5'-CAGGATGAGGACATGAGCACC-3' R 5'-CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC-3'
IL6	F5'-GTACTCCAGAAGACCAGAGG-3' R 5'-TGCTGGTGACAACCACGGCC-3'
iNOS	F5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3' R5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'
β-actin	F5'-CCGTCTTCCCCTCCATCGT-3' R5'-ATCGTCCCAGTTGGTTACAATGC-3'
GADPH	F5'-CCACTCCTCCACCTTTGAC-3' R5'-ACCCTGTTGCTGTAGCCA-3'

F : forward

R : reverse

 **Mode opératoire**

La solution de PCR a été préparée comme indiqué dans le tableau 9 ci-dessous.

Tableau 9: Préparation de la solution de PCR

Produits	Volume pour 1 tube (μ l)	Volume pour 9 tubes (μ l)
Master Mix	10	90
Amorce sens	1	9
Amorce antisens	1	9
H₂O	7	63
Volume total	19	171

Pour la réaction, 19 μ l du mélange et 1 μ l de cDNA ont été introduits dans chaque tube, un témoin négatif a été préparé, contenant le mélange en l'absence de cDNA. Les tubes ont été ensuite mélangés au vortex, puis introduits dans l'appareil de PCR (Flex Cyclor, Analytik Jena). La réaction de PCR a été réalisée en 31 cycles pendant 1h 46 min.

Pour l'électrophorèse des ADN obtenus, 10 μ l d'échantillon et 6 μ l de marqueurs de poids moléculaire compris entre 50 et 2000 Pb ont été déposés dans chaque puits d'un gel d'agarose 2% et laissé pour migration pendant 45 min sous un courant de 110V, 147MA et 16W. Le gel a été enfin visualisé (le GelRed est utilisé pour la visualisation) sous lumière UV (Transilluminator UV Solo Biometra) et photographié ou enregistré (Biometra UV/doc UVITEC Cambridge). Les intensités des bandes ont été déterminées à l'aide du logiciel Image J. Le rapport intensité des bandes du gène d'intérêt / intensité des bandes du gène témoin a permis de mettre en évidence l'effet des composés sur l'expression du gène.

II-2-9. Extraction et Préparation des protéines (Hwang *et al.*, 2009)

✚ Mode opératoire

Les cellules (microglies) ont été incubées dans des plaques de culture cellulaire de 24 puits, et ensuite traitées avec les extraits de plantes aux concentrations utilisées dans les tests précédents. Après 24 d'incubation, les cellules ont été collectées pour l'extraction des protéines.

Extraction des protéines

L'extraction des protéines a été faite selon la procédure suivante :

Les cellules ont été cultivées dans le milieu de culture approprié, à raison de 5.10^6 cell/ml.

Les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS à 4°C et 100 µl de tampon d'extraction y ont été ajoutés.

Les échantillons ont été collectionnés et manipulés dans la glace.

Les cellules ont été lysées pendant 30 min dans le tampon de lyse.

Les lysats ont été clarifiés par centrifugation à 12.000 rpm ou 16.000 g 4°C, 10 min.

Les surnageants ont été transférés (sans aucun culot) dans de nouveaux tubes, et les tubes ont été toujours maintenus dans la glace.

La concentration des protéines obtenues a été déterminée à l'aide du kit de dosage des protéines par l'acide Bicinchonique.

Tableau 10: Tampon d'extraction des protéines (Hwang *et al.*, 2009)

Solution	Pour 10ml
50mM Tris/HCl, pH 7.5	500µl 1M
5mM EDTA pH 8	100µl 0.5M
5mM EGTA pH 8	100µl 0.5M
2mM DTT	20µl 1M
100mM β-glycerophosphate (β-GL)	1ml 1M
10mM Na-Vanadate	100µl 1M
10mM Na-Fluoride	100µl 1M
10mM Pefablock (AEBSF, 4-[2-aminoethyl]-benzenesulfonyl fluoride)	100µl 1M
10µg/ml Aprotinin	50µl 2mg/ml
10µg/ml Antipain	50µl 2mg/ml
10µg/ml Leupeptin	50µl 2mg/ml

Quantification des protéines (Hwang *et al.*, 2009)

Principe

Le principe de dosage des protéines par l'acide bicinchoninique (BCA) est similaire à celui de la méthode de Lowry, en ce sens que les deux reposent 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 réduction est proportionnelle à la quantité de protéine présente. Le BCA forme un complexe pourpre-bleue avec le Cu^{1+} en milieu alcalin, permettant ainsi d'évaluer la réduction alcaline des ions Cu^{2+} par les protéines.

Mode opératoire

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

- la solution d'acide Bicinchoninique constituée de 1000 ml d'une solution contenant l'acide bicinchoninique, le carbonate de sodium, le tartrate de sodium et le bicarbonate de sodium dans du NaOH 0.1N.
- Une solution de Sulfate de cuivre. Ce réactif B est constitué de 25 ml d'une solution contenant 4% (w/v) Copper (II) sulfate pentahydraté.
- Une solution étalon Albumine de sérum bovin.

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, nous avons introduit 25 μ l de la solution de BSA et 200 μ l de BCA. L'étalonnage a été réalisé dans une gamme de concentrations allant de 200-1000 μ g/ml. 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 ELISA.

II-2-10. Séparation des protéines par SDS page (Fu *et al.*, 2008)

Principe

L'électrophorèse SDS-PAGE (électrophorèse en 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.

+ Mode opératoire

- 40µl de protéine ont été mélangés avec 20µl 3x loading buffer (composition en annexe), chauffé pendant 5 min à 95°C, brièvement homogénéisé
- 10-15 µg de protéine ont été introduits dans un gel 10.5% SDS-PAGE
- Les produits ont été introduits dans le gel et laissés pour migration pendant 10min à 130 V, le voltage a été ensuite changé à 200V jusqu'à ce que la bande de marcation de 33 kDA approche la fin du gel : Le MAPK migre approximativement entre 38-50 kDA.

Préparation de la cuve d'électrophorèse et du gel

Le support de la plaque de gel a été placé sur sa base. Les deux loquets inférieurs ont été ensuite verrouillés pour une bonne stabilité du dispositif. Un sachet en cassette prêt à l'emploi a été par la suite ouvert et les excédents de tampon ont été éliminés. Par la suite, les deux faces plastiques ont été bien essuyées. La cassette de gel a été ensuite soigneusement adaptée dans son support. Le système de verrouillage a été refermé en vissant fermement mais sans excès. Le support de la base d'assemblage a été dissocié, puis l'ensemble support + cassette de gel a été inséré dans la cuve à électrophorèse.

Remplissage de la cuve

Le compartiment intérieur a été rempli (entre la cassette de gel et la plaque de barrage) avec 80mL de tampon de migration pH 8 (composition en annexe).

Le compartiment principal de la cuve a été rempli avec 1,5 l de tampon de migration pH 8, jusqu'à atteindre environ 5 cm en dessous de la limite de remplissage.

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 µl d'échantillon chauffé de référence, et de 10 µl d'un mélange étalon de protéines ont été chacun soigneusement introduits dans le gel au moyen d'une micropipette.

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 ensuite 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, durée 40 minutes (l'alimentation du générateur s'arrête automatiquement lorsque les 40 minutes sont écoulées). 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.

Récupération du gel

Après la fin de la migration, le couvercle a été ouvert, et le bloc support + gel d'électrophorèse a été sorti du dispositif. Le tampon présent dans le compartiment interne a été éliminé dans un récipient à déchets. 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.

Transfert des protéines sur une membrane de Nitrocellulose

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 ont été transférées du gel à une membrane de Nitrocellulose (environ 1h).
- Après le transfert, la membrane a été colorée avec du Rouge ponceau (0.1% Ponceau S Red dans 5% d'acide acétique) et scannée.
- 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.
- La membrane a été lavée avec 15ml de TBST pendant 3 phases de 5 min chacune
- La membrane a été incubée avec un anticorps primaire (IgG de lapin) dirigé contre le phospho p44/42-MAPK (dilution 1:2000, du lapin) toute la nuit à 4°C dans 10ml de TBST 5% (w/v) BSA.
- La membrane a été lavée avec 15ml de TBST pendant 3 phases de 5 min chacune à la température ambiante.
- La membrane a été incubée avec un anticorps primaire dirigé contre l'IgG de lapin (couplé à la phosphatase alcaline, dilution 1 :3000) pendant 1-2 h dans 10ml de TBST à température ambiante.
- La membrane a été lavée avec 15ml de TBST pendant 3 phases de 5 min chacune à température ambiante.
- La membrane a été équilibrée dans du tampon Tris 150 mM, pH 9.5 pendant 2 min à température ambiante.
- La réaction a été colorée avec du BCIP/NBT dans du Tris pH 9.5 à température ambiante.

II-2-11. Inhibition de l'activité de la p38 MAP Kinase et du JNK3 par les composés actifs (Deshpanda *et al.*, 1997)

Principe

Dans cette expérience, les inhibiteurs compétissent avec l'ATP pour la fixation dans la même poche au niveau du site actif des enzymes p38 MAP Kinase et JNK3, résultant en une inhibition de la réaction de phosphorylation de l'ATF-2. Le degré de phosphorylation de l'ATF-2 corrobore ainsi inversement avec le potentiel de l'inhibiteur.

Principe de dosage par ELISA

La technique ELISA est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

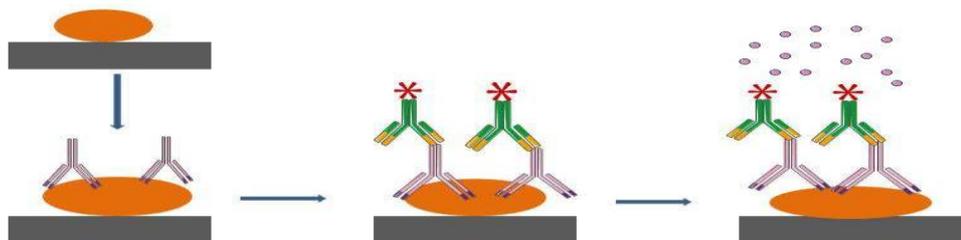


Figure 12: Montage du dosage par Elisa (Owona, 2013)

Mode opératoire

Une plaque de culture cellulaire de 96 puits a été cotée avec de l'ATF-2, toute la nuit à 4°C. Le tampon de blocage a été ajouté à température ambiante et la plaque a été incubée pendant 30 min avant l'addition du mélange contenant l'enzyme, en présence ou en absence des composés tests. La réaction du p38 α a été réalisée en utilisant la kinase (12 ng par puits), l'ATP (100 μ M) pendant 45 min à 37 °C. La phosphorylation de l'ATF-2 a été détectée avec un anticorps spécifique anti-phospho ATF-2 (Thr69/71), 60 min, 37 °C. Pour le test du JNK3, la kinase (10ng par puits), l'ATP (1 μ M) et un temps d'incubation de 45 min à 37 °C ont été appliqués. La phosphorylation de l'ATF-2 s'est faite avec un anticorps spécifique anti-phospho ATF-2 (Thr 69/71) (60min à 37 °C). Après chaque période d'incubation, la plaque a été lavée 3 fois avec de l'eau doublement distillée. La DO a été mesurée après addition du substrat à 450 nm ou à 405 nm ; en fonction du substrat utilisé. L'inhibiteur de p38 MAP Kinase SB203580 et l'inhibiteur du JNK3 SP600125 ont été utilisés comme composés de référence.

II-2-12 Effet de la Baicaline sur l'amélioration des changements neurologiques dans un modèle de la maladie d'Alzheimer (Zhang *et al.*, 2012)

Matériel

La baicaline a été obtenue de Carbosynth Ltd. (Compton, Berkshire, UK). Les « Nanostructured carriers » peuvent donner à la baicaline, qui possède une faible solubilité dans l'eau et une période de demi-vie courte, une meilleure biodisponibilité, un meilleur temps de rétention dans le sang. Dans cette étude, la baicaline a été préparée avec le « nanostructured carrier », Lipofundin, au rapport de concentration de 2mg/ml (baicaline/Lipofundin). Soixante mg de baicaline ont été mélangés et dispersés dans 30 ml de lipofundin. Subséquemment, la suspension a été homogénéisée en utilisant un Emulsiflex C3 (Avestin Inc., Canada).

II-2-12-1 Traitement avec la Baicaline

Deux groupes d'animaux ont été utilisés dans cette expérience et répartis puis traités de la manière suivante. Groupe 1: six souris APP/PS1-21, âgées de 3 mois, 3 mâles et 3 femelles, recevant un traitement de 10 jours à la baicaline (20 mg/kg de poids corporel) préparés avec le Lipofundin à la concentration de 2mg/ml et quotidiennement injecté par voie intrapéritonéale pendant 10 jours. Le second groupe de souris APP/PS1-21, comme témoin, a reçu une injection de 10 jours avec le même volume de Lipofundin. Les animaux ont été sacrifiés après 3 mois.

II-2-12-2 Evaluation du test de construction des nids (Nest Construction

Assay)

Un test de construction de nids (Wesson et Wilson, 2011) a été modifié pour déterminer les déficits sur le comportement social des souris APP/PS1 et les changements potentiels liés au traitement.

Les souris ont été individuellement acclimatées pendant au moins 24h dans des cages en plastique propres. Des cartes d'identification ont été réalisées afin de rendre l'expérience aveugle indépendamment de l'âge, du sexe et du génotype des souris. Deux heures avant le lancement de la phase obscure, des papiers en coton de 20 x 20 cm ont été introduits dans chaque cage. Le lendemain matin, (approximativement 16 heures après) les cages ont été inspectées pour la

construction des nids. Le test de construction de nids a été noté par un système de notation à 3 points: 1= Pas de pique ou de larmes sur le papier, 2= présence modérée de larmes ou de pique sur le papier mais pas de nid cohérent (pas groupés à un coin de la cage) et 3= la grande majorité de papier découpé en pièces et regroupé à un coin de la cage (Wesson et Wilson., 2011). Les figures 12 et 13 ci-dessous représentent respectivement une photographie des souris transgéniques utilisées ainsi qu'une image de la dissection des cerveaux de souris.



Figure 13. Représentation schématique mettant en évidence le cerveau de souris (Owona, 2012)

II-2-12-3 Immunohistochimie (IHC) et évaluation / analyse des images (Quantification des dépôts de bêta-amyloïde et activation des microglies) (Zhang *et al.*, 2012)

Les souris traitées à la Baicaline et les témoins ont été sacrifiées après 10 jours de traitement. Les souris ont été anesthésiées avec de l'éther et perfusées intracardialement avec une solution de paraformaldéhyde à 4°C dans du PBS. Les cerveaux des souris ont été rapidement retirés et fixés dans du paraformaldéhyde à 4°C pendant toute la nuit. Les cerveaux fixés ont été coupés en 2

hémisphères, les hémisphères ont ensuite été incorporés dans la paraffine (3 micromètres) et montés dans des lames en silane. Les hémisphères des sections ont été colorés avec du HE (Hématoxyline et Eosine) comme décrit en annexe. Les anticorps suivant ont été utilisés: β -amyloïde (1:100, Abcam, Cambridge, UK) pour le dépôt de β -amyloïde, et Iba-1 (1:200, Wako, Neuss, Germany) pour l'activation des microglies.

Après les colorations au HE et immunocoloration, les sections des hémisphères ont été examinées par un microscope à lumière (Nikon Coolscope, Nikon, Düsseldorf, Germany). Les dépôts d'amyloïde bêta et d'Iba-1 ont été évalués au niveau des sections des hémisphères avec une attention particulière au niveau du néocortex et de l'hippocampe. Toutes les sections ont été numérotées au hasard et analysées par 2 membres du laboratoire et observateurs indépendants, qui n'étaient pas au courant des traitements effectués. Les plaques d'amyloïde β et les cellules Iba-1+ dans le néocortex et l'hippocampe ont été comptées manuellement, par un dépôt clair des plaques, et les noyaux cellulaires pour les cellules.

II. 3 Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées au moins deux fois et en triplicata. Les résultats des observations multiples ont été exprimés en valeur \pm SD. Pour les analyses, nous avons utilisé le test ANOVA à un paramètre, qui permet de tester si les moyennes de plusieurs valeurs ou groupes de traitement sont différentes entre elles. Ce test a été suivi à chaque fois du Dunnett test qui permet de comparer chaque groupe par rapport à un contrôle.

La différence dans le nombre de plaques/cellules, ou l'expression des niveaux de mRNA entre les différents groupes et les témoins a été analysée par le test ANOVA à un paramètre suivi par le Dunnett Multiple Comparison test (unpaired t-tests) (Graph Pad Prism 5.0 software). Pour toutes les analyses statistiques, les niveaux significatifs ont été considérés à $P < 0.05$.

CHAPITRE 3: RESULTATS

Les différents extraits bruts préparés ont été par la suite fractionnés par chromatographie flash et par chromatographie de colonne sur gel de silice. Cinq fractions ont été obtenues d'*Entada africana* à savoir : EaChl (CH₂Cl₂), Ea5 (CH₂Cl₂/MeOH 5%), Ea10 (CH₂Cl₂/MeOH 10%), Ea25 (CH₂Cl₂/MeOH 25%), et EaMet (MeOH). Cinq fractions ont été obtenues de *Khaya grandifoliola* à savoir : Kg Chl (CH₂Cl₂), Kg 5 (CH₂Cl₂/MeOH 5%), Kg10 (CH₂Cl₂/MeOH 10%), Kg 25 (CH₂Cl₂/MeOH 25%), et Kg Met (MeOH). A l'issue de la chromatographie sur gel de silice, 24 sous fractions ont été obtenues de la même plante.

III. Effet anti-inflammatoire d'*Entada africana* sur l'activité des macrophages (Raw 264.7) et des microglies (N9)

III-1. Effet d'*Entada africana* sur les macrophages

III.1.1 Test de viabilité cellulaire au MTT

Ce travail rapporte pour la première fois l'effet d'*E. africana* sur les cellules Raw 264.7. Avant le début des expériences, nous avons examiné l'effet de l'extrait brut et des différentes fractions d'*E. africana* sur la viabilité des cellules. L'examen de la cytotoxicité des extraits bruts et fractions d'*E. africana* sur les macrophages par le test au MTT indique que ces composés, même à 100 µg/ml, n'affectent pas la viabilité des cellules (Figure 14A). Les concentrations utilisées dans nos expériences n'ont exercé aucune cytotoxicité même à des concentrations élevées après 24h d'incubation. Dans chaque cas, la viabilité cellulaire était maintenue autour de 96% comme déterminé par le test au MTT. En plus, nous avons étudié l'effet des différentes fractions sur la viabilité des macrophages. Il ressort de la figure 14 B que les fractions isolées ne présentent pas un effet significatif sur la viabilité des cellules à 100 µg/ml après 24h d'incubation (Figure 14, Figure 15).

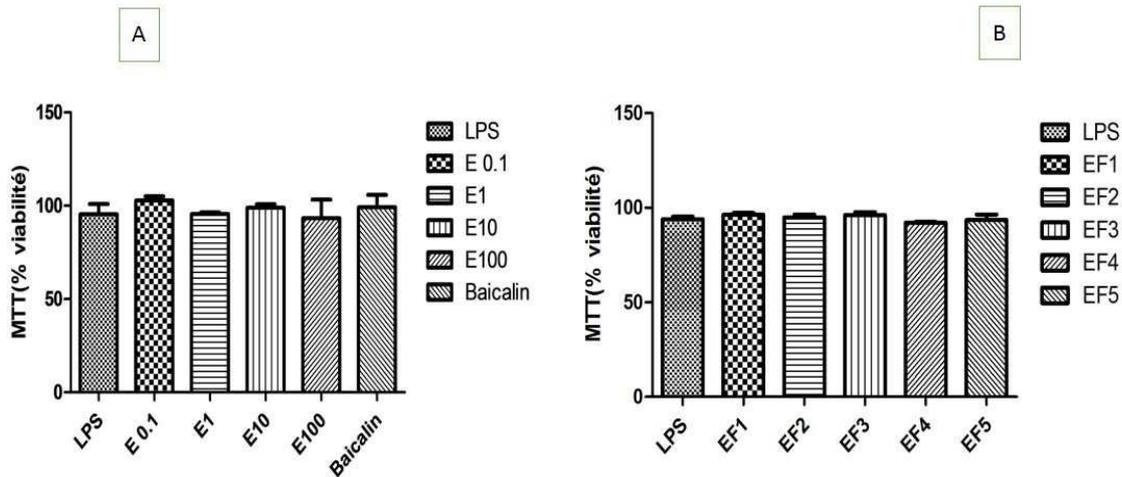
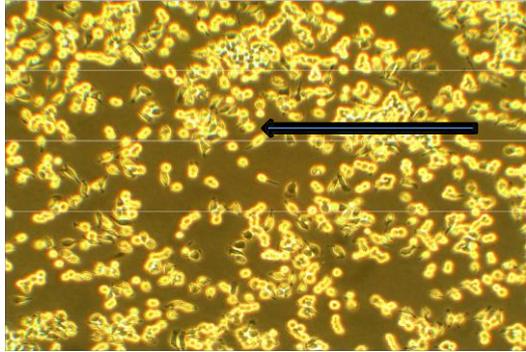
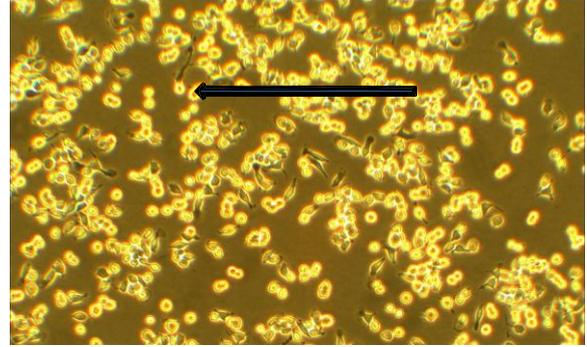


Figure 14. Effet de la baicaline, des extraits bruts et des fractions d'*E. africana* sur la viabilité des macrophages traités au LPS. (A).

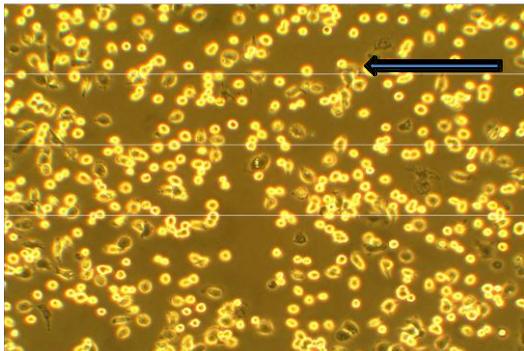
Les cellules Raw 264.7 (5.10^5 cell/ml) ont été incubées avec les concentrations indiquées d'EA, en présence de LPS ($1\mu\text{g/ml}$) pendant 24h. La viabilité des cellules a été par la suite déterminée au moyen du test au MTT. **(B)**. Les cellules Raw 264.7 (5.10^5 cell/ml) sont incubées avec les fractions d'EA à la concentration fixe de $100\mu\text{g/ml}$ en présence de LPS ($1\mu\text{g/ml}$) pendant 24h. La viabilité des cellules est ensuite déterminée par le test au MTT formazan.



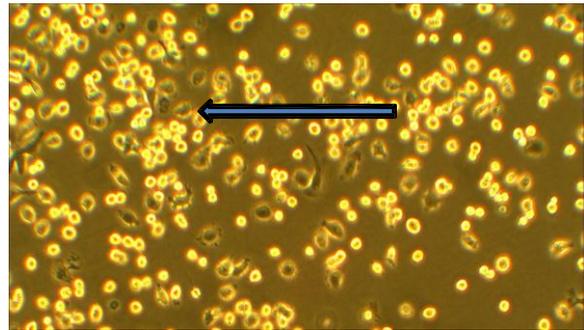
DMSO 24h



***Entada africana* 100µg/ml, 24h**



***Entada africana*+LPS+ 24h**



***Entada africana* + LPS, 48h**

Figure. 15. Effet d' *Entada africana* sur la viabilité des cellules Raw 264.7 (A) induites ou non par les LPS (1µg/ml) pendant 24 et 48h. Les images des cellules sont obtenues en utilisant un microscope à inversion couplé à une vidéo-caméra. Les flèches indiquent les cellules observées au microscope. Grossissement x20.

III. 1-2 Effet des extraits et des fractions d'*Entada africana* sur la production de NO

L'effet des extraits bruts et fractions d'*E. africana* sur la production de NO induite par les LPS a été investigué en mesurant l'accumulation de nitrite, estimée par la réaction de Griess dans le milieu de culture. Après 24 h de traitement avec les LPS (1µg/ml), la concentration de nitrite dans le milieu de culture a augmenté significativement de 3 fois. Lorsque les extraits sont ajoutés dans le milieu, une inhibition significative ($P < 0.01$) et dose-dépendante de NO a été observée en présence de l'extrait brut (à partir de 10 µg/ml) et des fractions d'*E. africana*. Les valeurs des IC_{50} obtenues sont 2.123, 1.234, 6,567, 12,456 et 1,978µg/ml respectivement pour les cinq fractions. Le potentiel inhibiteur de la production de NO induite par le LPS est : Ea5, Ea25, EaMet, EaChl et Ea10 (Tableau11). Pour les expériences suivantes, la fraction Ea5 a été utilisée ($IC_{50}=1.234\mu\text{g/ml}$) (Figure 16). Quatre des cinq fractions obtenues ont présenté un pourcentage d'inhibition du NO supérieur à celui de la baicaline.

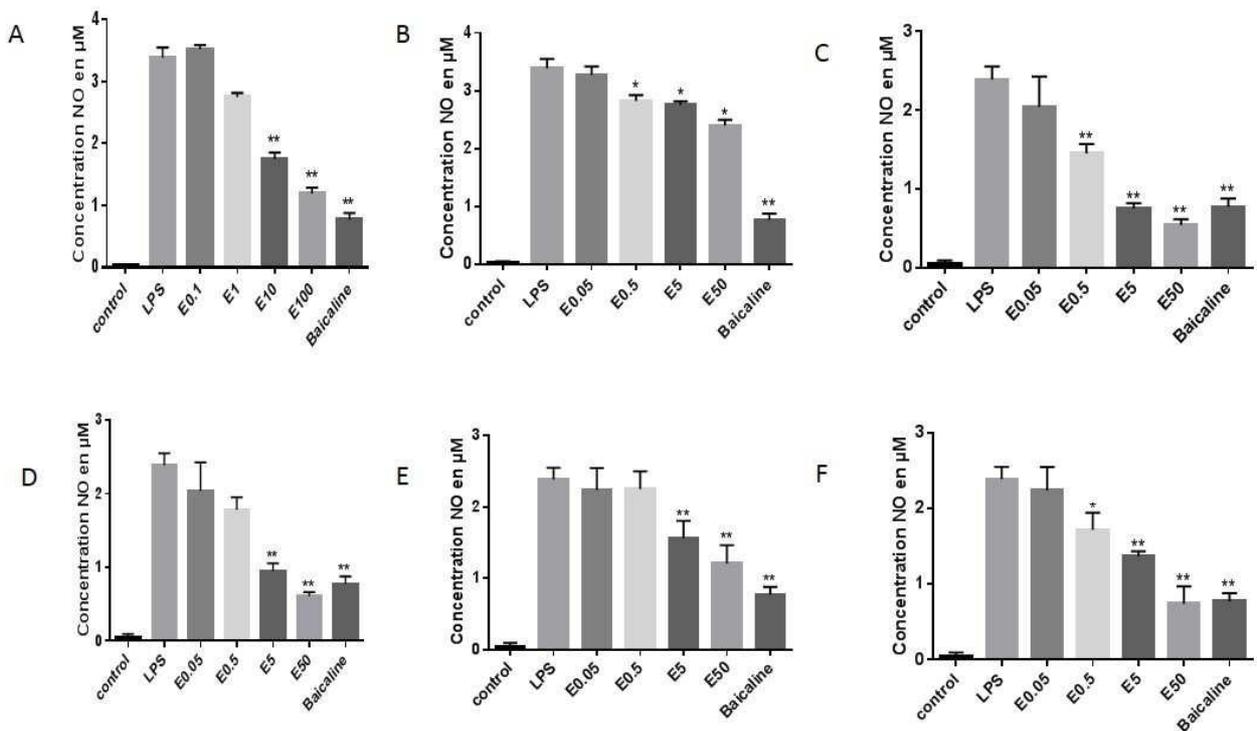


Figure 16. Inhibition de la production de NO induite par les LPS en présence de l'extrait brut, de la baicaline et des fractions d'*E. africana*. L'extrait brut a été fractionné et traité avec les cellules en présence ou en absence de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Les composés ont été appliqués à des concentrations allant de 0.05 à 50 μg d'extrait/ml de milieu de culture. Après 24h d'incubation, le surnageant cellulaire est collecté et l'oxyde nitrique est dosé selon la méthode décrite dans la section Matériel et Méthodes. **A:** Extrait brut, **B:** Fraction au CH_2Cl_2 , **C:** Fraction au $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 5%, **D:** Fraction au $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10%, **E:** Fraction au $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 25% **F:** Fraction au MeOH. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ et *** $P < 0.001$ en comparaison avec le groupe traité au LPS.

.Tableau 11. Inhibition de la production de NO induite par le LPS par les fractions d'*E. africana* et la baicaline (valeurs des IC50 en µg/ml)

Numéro de la fraction	IC ₅₀ en µg/ml
1- EaChl	61.25
2- Ea5	18.36
3- Ea10	42
4- Ea25	54.66
5- EaMet	35.75
Baicaline	92µM

III-1.3 Effet de la fraction Ea5 sur la production de H₂O₂ intracellulaire

Les ROS sont des médiateurs de l'inflammation dans plusieurs maladies inflammatoires chroniques, aussi bien dans les maladies inflammatoires que dans les réactions normales de défense de l'organisme. Nous avons évalué la capacité de la fraction active d'*Entada africana* à moduler la production intracellulaire de H₂O₂ en utilisant les macrophages Raw 264.7. Comme indiqué dans la figure 17 ci-dessous, Ea5 inhibe la production intracellulaire de ROS induite par les LPS à 0.05, 0.5 et 5 µg/ml ($P < 0.05$). Cependant, aucune inhibition significative n'est observée à 50µg/ml.

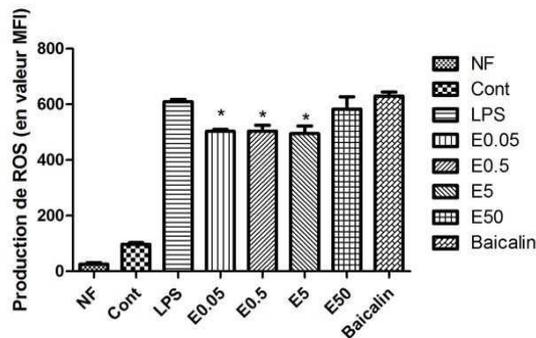


Figure 17. Effet de la fraction CH₂Cl₂/ MeOH 5% d'*E. africana* sur la production de H₂O₂ par les cellules Raw 264.7 traitées par les LPS (5x10⁵cell/ml). Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations d'*E. africana* et de la baicaline (5μg/ml) en présence ou en absence de LPS (1μg/ml) pendant 30 min. Le niveau de ROS généré a été déterminé par cytométrie de flux. * $P < 0.05$ en comparaison au groupe traité au LPS.

III-1.4 Effet de la fraction Ea5 sur l'activité phagocytaire des cellules Raw 264.7

L'activité phagocytaire des macrophages a été étudiée en utilisant le FITC-dextran, en présence ou en absence de LPS et de l'extrait Ea5. Ce test nous a permis d'évaluer l'effet des LPS sur l'activité phagocytaire des macrophages. D'après la figure (18) ci-dessous, nous n'avons observé une diminution de l'activité phagocytaire des cellules en présence de LPS (A). Par contre, en absence de LPS (B) nous notons une augmentation significative de l'activité phagocytaire des macrophages aux concentrations de 5, 50μg/ml et avec la Baicaline.

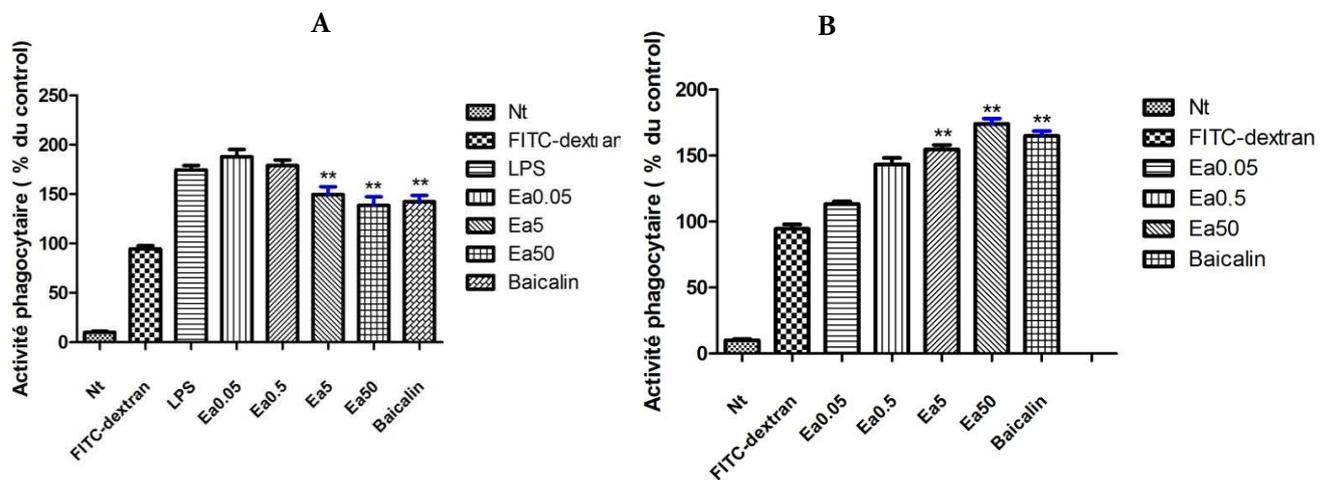


Figure 18. Effet de la fraction Ea5 sur l'activité phagocytaire des cellules Raw 264.7 à la suite d'une exposition aux LPS. (A) les cellules Raw 264.7 (2.10^6 cell/ml) ont été prétraitées avec Ea5 (0 ; 0.05 ; 0.5 ; 5 et $50\mu\text{g/ml}$) et la baicaline ($5\mu\text{g/ml}$), elles ont par la suite été stimulées avec du FITC-dextran (1mg/ml) en présence (A) ou en absence de LPS ($1\mu\text{g/ml}$) (B) pendant 6h. L'activité phagocytaire a été déterminée par cytométrie de flux. $**P<0.01$ en comparaison au groupe traité au LPS.

III-1.5 Effet de la fraction Ea5 sur l'expression du mRNA des cytokines pro-inflammatoires

Nous avons ensuite évalué la capacité d'Ea5 à supprimer la production des cytokines pro-inflammatoires IL6, IL1 β et TNF α dans les cellules Raw 264.7 stimulées par les LPS. On a observé que $1\mu\text{g/ml}$ de LPS augmente significativement l'expression des niveaux de mRNA des TNF α , IL1 β et IL6 dans ces cellules. Ea5 inhibe ($P<0.001$) l'expression des mRNAs des cytokines IL6, TNF α et IL1 β à 0.5, 5 et $50\mu\text{g/ml}$ respectivement pour les 2 premières et à toutes les concentrations testées pour la dernière (Figure 19 A, B et C). Le même effet a été observé pour ce qui est de la Baicaline, le composé utilisé comme référence.

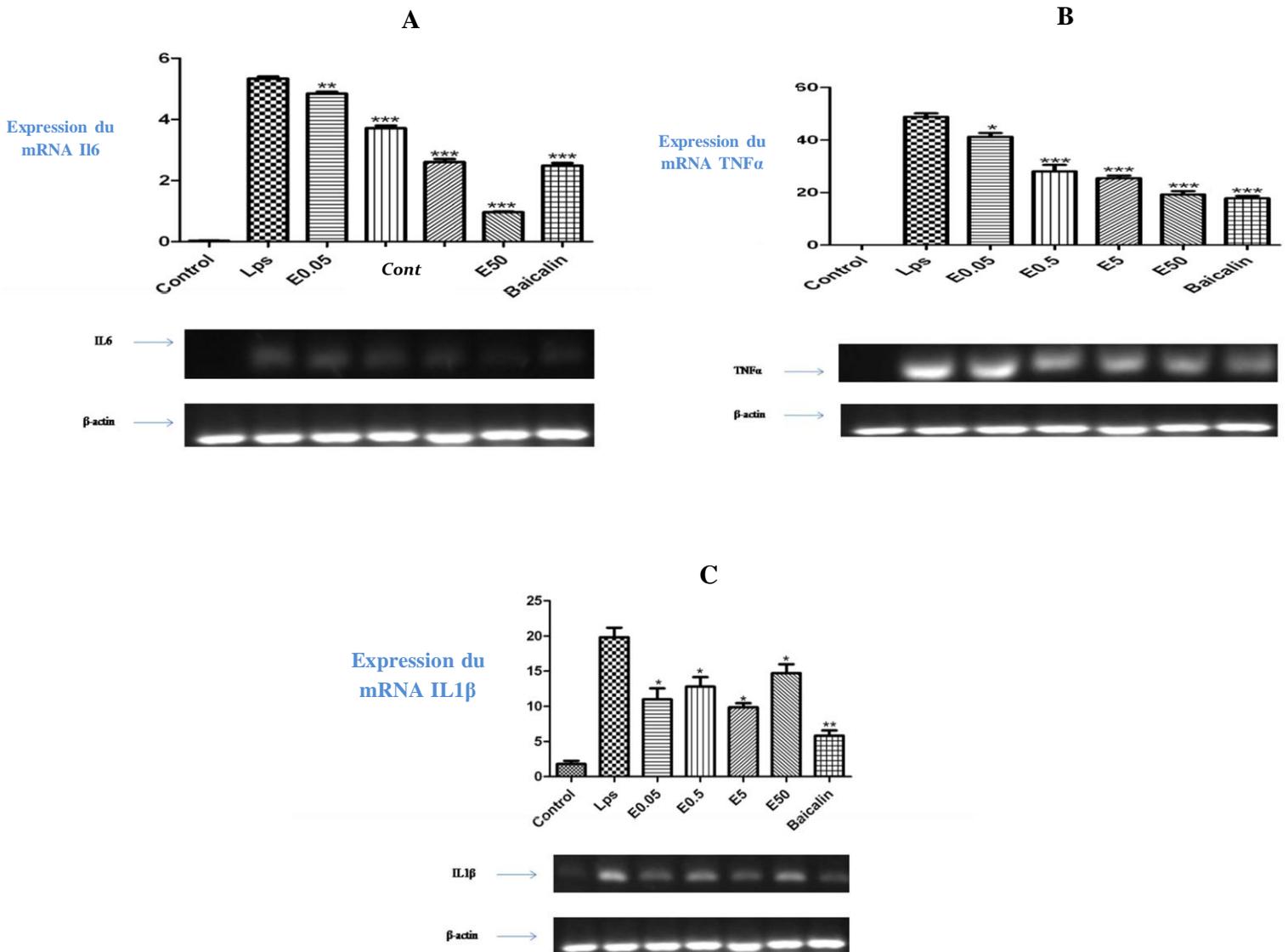


Figure 19. Effet de la fraction au CH₂Cl₂/ MeOH 5% d'*E. africana* sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires sur les macrophages traités par les LPS. Les cellules Raw 264.7 ont été prétraitées avec différentes concentrations de Ea5 et ou Baicalin, avec ou sans LPS pour une période de stimulation de 24h. Les RNAs totaux des cellules ont été isolés et les niveaux d'IL1β, TNFα et IL6 ont été mesurés par RT-PCR. L'expression de la β-actin a été utilisée comme contrôle interne. A. IL6, B. TNFα, C. IL1β. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ et *** $P < 0.001$ en comparaison avec le groupe traité au LPS.

III-1.6 Effet de la fraction Ea5 sur l'expression du mRNA des cytokines anti-inflammatoires

L'effet de Ea5 sur l'expression des mRNA des cytokines anti-inflammatoires a également été investigué, puisque ces cytokines sont également réputées abaisser et terminer la réaction inflammatoire. Comme indiqué dans la figure (20), l'expression des mRNAs des cytokines IL10 et IL13 a été significativement accrue après le traitement avec Ea5 à 50 μ g/ml ($P < 0.001$).

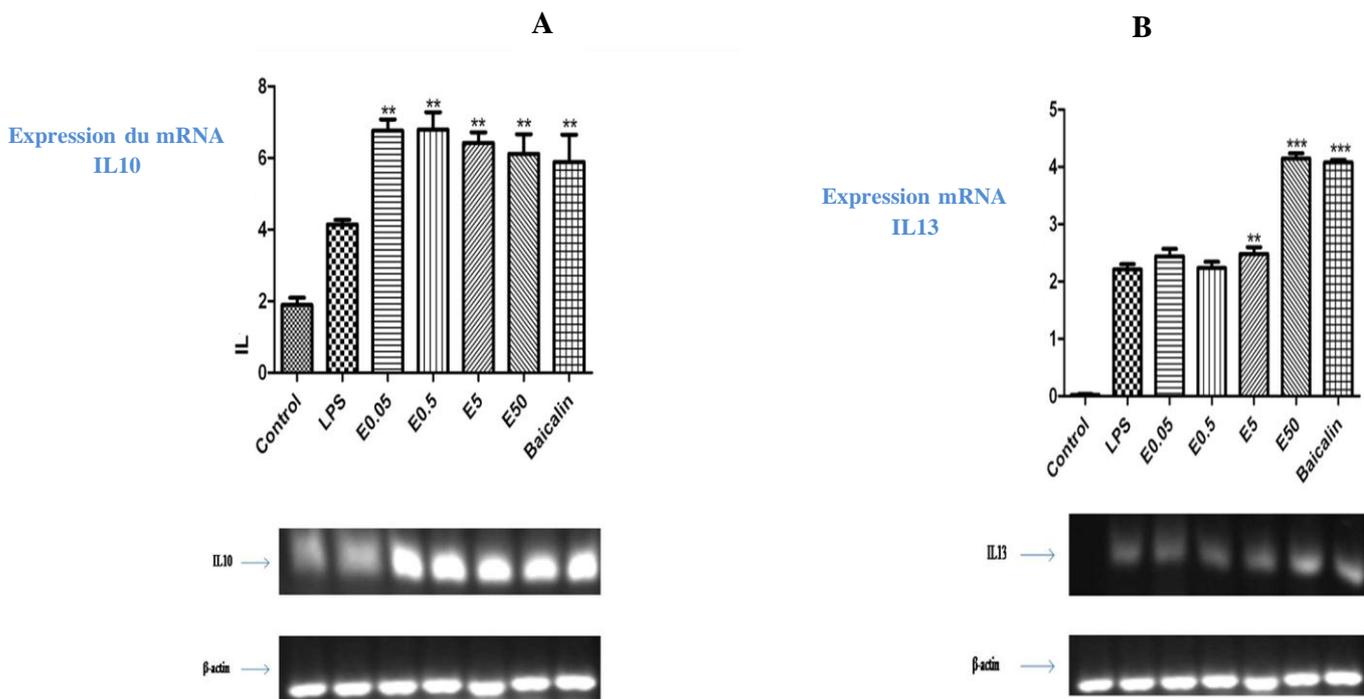


Figure 20. Effet de la fraction Ea5 sur l'expression des cytokines anti-inflammatoires par les macrophages. Les cellules Raw 264.7 ont été prétraitées avec différentes concentrations de Ea5 et ou de la baicaline, avec ou en absence de LPS pour une période de stimulation de 24h. Les RNAs totaux des cellules ont été isolés, et les niveaux d'expression des mRNAs des cytokines IL10 et IL13 ont été mesurés par RT-PCR. L'expression de la β -actin a été utilisée comme contrôle interne. A. IL10 et B. IL13. ** $P < 0.01$ et *** $P < 0.001$ en comparaison avec le groupe traité au LPS.

III-1.7 Effet de la fraction Ea5 sur l'expression du mRNA de l'inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)

Nous avons réalisé la RT-PCR pour répondre à la question de savoir si l'inhibition de la production de NO par les macrophages traités par Ea5 est liée à l'inhibition de l'expression du mRNA de l'iNOS. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure (21), dans laquelle 1µg/ml de LPS accroît significativement le niveau d'expression du mRNA de l'iNOS après 24h de traitement. Ea5 a inhibé significativement ($P < 0.001$) l'expression du mRNA de l'iNOS à toutes les concentrations testées. Le même résultat est observé avec la baicaline.

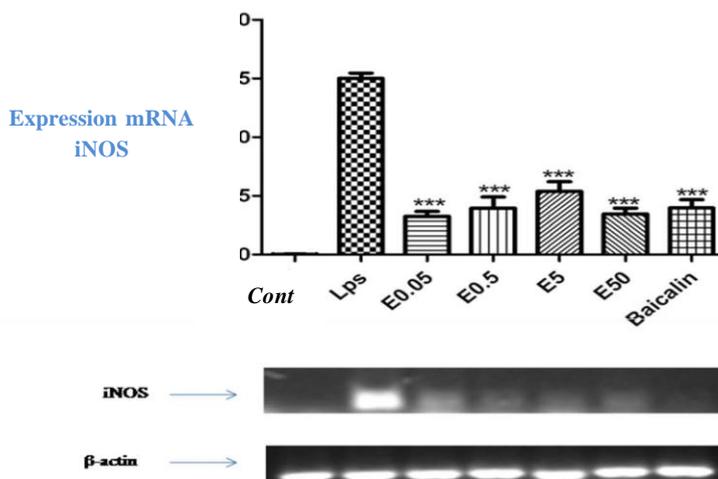


Figure 21. Effet d'Ea5 et de la baicaline sur l'expression de l'iNOS par les macrophages. Les cellules Raw 264.7 ont été incubées en présence ou en absence de LPS (1µg/ml) ensemble avec les concentrations indiquées des extraits de plante et de la baicaline. Après 24 h d'incubation, l'expression du mRNA de l'iNOS est quantifiée par RT-PCR. *** $P < 0.001$ en comparaison avec le groupe traité au LPS.

III-1.8 Effet de la fraction Ea5 sur l'activité de la p38 MAP Kinase

Ea5 et la baicaline ont été testés pour leur capacité à inhiber l'activité de la p38MAPKinase et l'inhibiteur de cette enzyme SB203580 ($IC_{50} = 0.048 \pm 0.01 \mu M$) a été utilisé comme composé de référence. Comme indiqué sur la figure (22) ci-dessous, Ea5 présente un effet inhibiteur sur

l'enzyme dans la gamme de concentrations testées (0.1 à 100 µg/ml). Une inhibition significative a par contre été observée avec la baicaline.

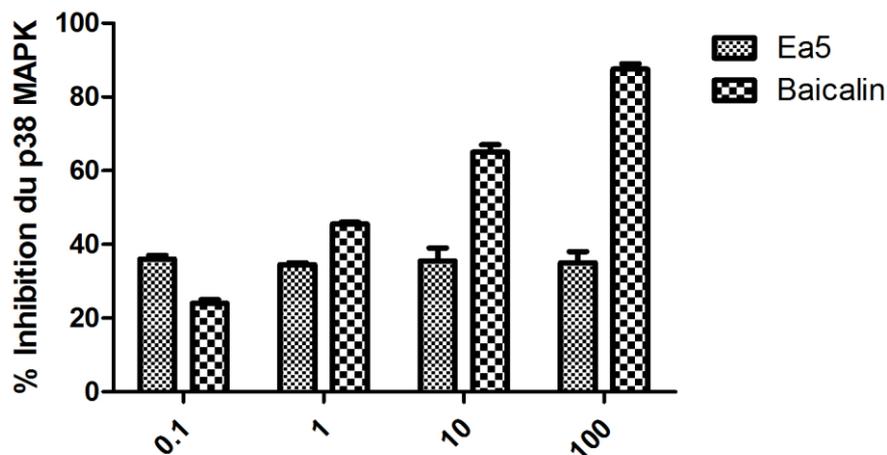


Figure 22. Effet d'Ea5 et de la baicaline sur l'inhibition de l'activité de la p38 MAPK Kinase. Le potentiel inhibiteur de la fraction et de la baicaline ont été évalués en utilisant un test ELISA contenant du BSA (0.01%) dans le tampon kinase. Le SB203580 a été utilisé comme composé de référence.

III-1.9 Discussion partielle

L'oxyde nitrique est synthétisé par l'enzyme nitric oxide synthase inductible à partir de la L-arginine utilisant le NADPH et l'oxygène moléculaire par plusieurs cellules inflammatoires parmi lesquelles les macrophages, les neutrophiles et les cellules neuronales. Le NO est à l'origine d'une variété d'effets biologiques parmi lesquels la vasodilatation, la neurotransmission, l'inhibition de l'adhérence et de l'agrégation des plaquettes aussi bien que l'élimination des agents pathogènes

(Foresti *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008). Il a été démontré que l'induction de l'iNOS produit une grande quantité de NO dans des conditions de l'inflammation (Shen *et al.*, 2001). Ainsi, les composés qui inhibent l'expression de l'iNOS et la production du NO pourraient être de bons candidats pour le traitement des maladies causées par une surproduction de NO (Horstman *et al.*, 1999).

Dans cette étude, nous avons évalué l'effet de l'extrait brut et des fractions d'*E. africana* sur la production de NO par les cellules Raw264.7. Nous avons par la suite examiné l'effet de la fraction la plus active sur la production de ROS intracellulaire et l'expression du mRNA de l'iNOS par ces cellules. Entre autres, nous avons exploré l'effet de la fraction Ea5 sur l'expression des mRNAs des cytokines pro et anti-inflammatoires, et enfin, nous avons évalué l'effet de cette fraction sur l'inhibition de la p38 MAPK Kinase.

Comme prérequis à une évaluation appropriée des propriétés biologiques des composés purs isolés et des mélanges de composés, il ya la détermination exacte de la cytotoxicité associée à de longues périodes d'incubation de ces composés sur les cellules. Ainsi, l'effet de l'extrait brut et des fractions sur la viabilité cellulaire a été évalué en utilisant le test au MTT. L'extrait de plante et les fractions n'ont présenté aucune toxicité significative sur la viabilité des cellules, indiquant ainsi que l'effet immunomodulateur des composés sur les cellules Raw 264.7 n'est pas dû à une cytotoxicité.

La production excessive de NO par les macrophages est impliquée dans la pathogénicité de plusieurs maladies parmi lesquelles la maladie d'Alzheimer, le cancer et le diabète. L'exposition des cellules Raw 264.7 aux LPS pendant 24 h a été associée à une accumulation de nitrite dans le milieu de culture, suggérant une induction de la production de NO suite au traitement par les LPS. Cette surproduction de NO induite par les LPS a été significativement inhibée par l'extrait brut et les fractions d'*E. africana* ainsi que confirmé par la baicaline, le composé de référence utilisé. Sur la base des valeurs des IC₅₀, le potentiel inhibiteur des fractions testées peut être classifié de la manière suivante : Ea5 > Emet > Ea10 > Ea25 > EaChl. Puisque la fraction Ea5 était la plus active, ses activités ont été par la suite évaluées.

Il a été démontré que la stimulation des macrophages par les LPS induit la transcription de l'iNOS avec un accroissement de la production de NO (Yim *et al.*, 2009). Ainsi, le screening des

médicaments utilisant l'oxyde nitrique et l'effet sur l'expression du mRNA de l'iNOS semble être une approche appropriée pour la découverte des composés anti-inflammatoires. La fraction Ea5 aussi bien que la baicaline ont significativement inhibé l'expression du mRNA de l'iNOS (Figure 21) dans les cellules Raw 264.7 et d'après les résultats, il pourrait être suggéré que la fraction Ea5 exerce son action anti-inflammatoire à travers une inhibition de l'iNOS tel que rapporté pour le cas de la baicaline (Wang *et al.*, 2012) (Gufu *et al.*, 2012).

Les ROS sont des molécules importantes produites par les cellules immunitaires lors de l'inflammation. Ces molécules contribuent à l'élimination des agents pathogènes au cours de la phagocytose (Whitaker-Menezes *et al.*, 2012). Cependant, une production excessive de ROS pourrait amplifier l'inflammation (Dumont et Beal, 2011). Nous avons ainsi examiné la capacité de la fraction Ea5 à abaisser la production des ROS (Fig.17) aux concentrations testées. Les analyses qualitatives et quantitatives ont révélé la présence des polyphénols dans l'extrait brut d'*E. africana* (Njayou *et al.*, 2013, Owona *et al.*, 2013). L'activité observée dans cette étude pourrait être due du moins en partie à ce potentiel antioxydant des polyphénols.

L'effet de la fraction Ea5 sur l'expression des mRNAs des cytokines pro et anti-inflammatoires parmi lesquels l'IL1 β , TNF α , IL6, IL13 et IL10 a été investigué. Ces cytokines amplifient l'inflammation (cytokines proinflammatoires) ou atténuent l'inflammation (cytokines anti-inflammatoires), et tout composé qui peut supprimer la production excessive des cytokines proinflammatoires et induire la production des cytokines anti-inflammatoires pourrait être un bon candidat pour la découverte de nouveaux médicaments anti-inflammatoires. Comme indiqué dans les Figures 19 et 20, Ea5, aussi bien que la baicaline suppriment significativement l'expression des mRNA des cytokines induites par les LPS dans les cellules Raw 264.7 et stimule l'expression des mRNAs de l'IL13 et de IL10, respectivement. Cette observation supporte les effets anti-inflammatoires et immunomodulateurs d'Ea5. Cette fraction pourrait de ce fait contenir des composés prometteurs ayant une bonne activité anti-inflammatoire.

Le MAPK est responsable de l'induction des signaux cellulaires entraînant la production des cytokines proinflammatoires dans les cellules. Dans ce test, les composés compétissent avec l'ATP pour la fixation sur le site actif de la kinase et inhibent l'activité de l'enzyme. Le p38 α MAPK phosphoryle le substrat ATF-2 et la quantité de phosphorylation reflète l'activité de l'enzyme. Une inhibition de 30% a été obtenue avec Ea5 à des concentrations allant de 0.1 à 100 μ g/ml

(Fig.22). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'inflammation induite par les LPS pourrait en partie être due à l'inhibition de la p38 MAPK Kinase.

Des composés phénoliques ont été détectés en grande quantité dans *E. africana* (Tchacondo *et al.*, 2011). L'analyse qualitative effectuée avec l'extrait brut d'*E. africana* a aussi révélé la présence des polyphénols dans cet extrait (Njayou *et al.*, 2013). Les effets biologiques des polyphénols ont été rapportés comme étant liés à leur habileté à influencer les signaux cellulaires et de moduler l'expression des cytokines pro and anti-inflammatoires (Antonios *et al.*, 2009; Hirata *et al.*, 2012). Ainsi, nous pouvons suggérer que les composés phénoliques présents dans *E. africana* pourraient être responsables des effets observés sur les cellules Raw 264.7.

III-1.10 Conclusion partielle

En conclusion, la présente étude a révélé que le traitement des macrophages par *E. africana* inhibe la production de NO induite par les LPS en supprimant l'expression du mRNA de l'iNOS. Ea5 a inhibé la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l' TNF α , l'IL6 et l'IL1 β , en supprimant leur activité transcriptionnelle. L'expression des mRNAs des cytokines anti-inflammatoires IL13 et IL10 a également été significativement stimulée par Ea5. La fraction Ea5 a aussi inhibé l'activité de la p38 MAPK Kinase. Ainsi, *E. africana* pourrait avoir un potentiel effet thérapeutique pour le traitement de l'inflammation et des maladies liées à l'inflammation.

III-2 Effet d'*Entada africana* sur les microglies (N9)

Introduction

La réponse inflammatoire dans le système nerveux central médiée par les microglies joue un rôle important dans la défense de l'hôte et est impliquée dans la pathologie des maladies neurodégénératives. Nous avons évalué la capacité d'*E. africana* à protéger les microglies face aux attaques inflammatoires en explorant l'effet de la fraction la plus active (Ea5) sur l'expression des mRNA des cytokines pro-inflammatoires. Enfin, nous avons étudié l'effet d'Ea5 sur l'inhibition de la p38 MAPK Kinase. Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec la Baicalin, un flavonoïde dont les propriétés anti-inflammatoires ont été reportées.

Méthodologie

Les écorces d'*E. africana* obtenues précédemment ont été testées sur une seconde lignée cellulaire. Les microglies de souris (N9) ont été stimulées par les LPS avec ou sans différentes concentrations de baicaline et de l'extrait/ fractions d'*E. africana*. La production de NO a été évaluée par la méthode de Griess. L'expression des mRNA des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6) et l'iNOS/NO a été mesurée par RT-PCR. L'inhibition de la p38 MAPK Kinase a été évaluée par ELISA.

III.2-1 Test de viabilité cellulaire au MTT

L'étude de la cytotoxicité de l'extrait brut et des fractions isolées sur les cellules N9 s'est faite en utilisant le test de viabilité cellulaire au MTT. Il ressort de ce test que les composés testés, même à 100 μ g/ml, n'affectent pas la viabilité des cellules N9 (Fig 23A). De plus, nous avons examiné l'effet des différentes fractions sur la viabilité des microglies. Il résulte de la Fig.23 B que les fractions isolées ne présentent pas d'effet significatif sur la viabilité des cellules à 100 μ g/ml après 24h d'incubation.

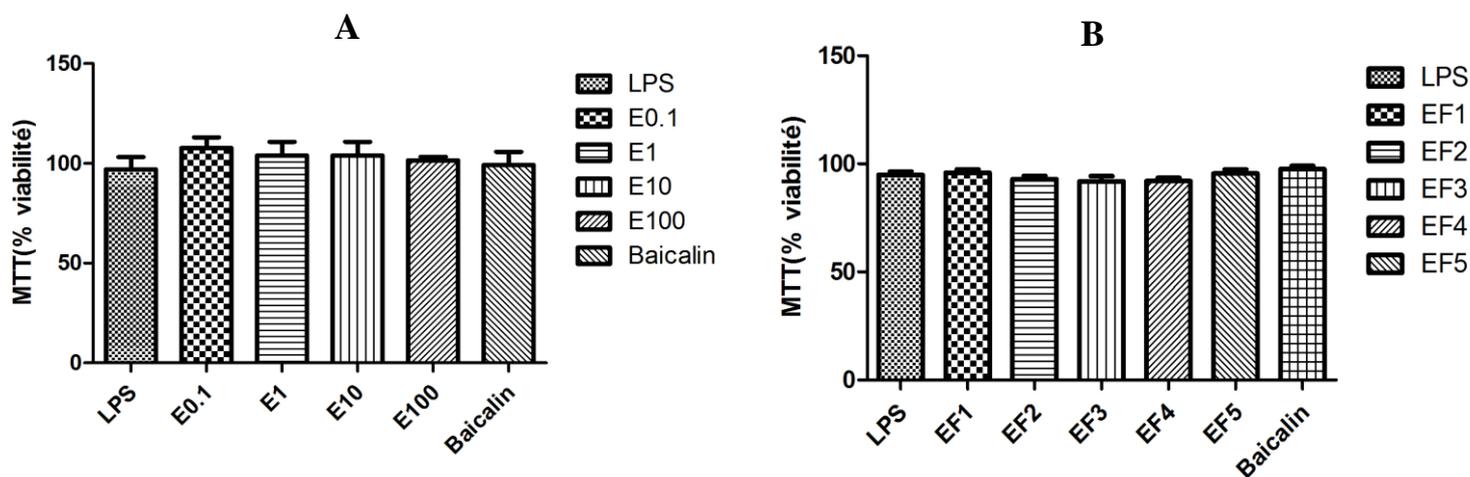
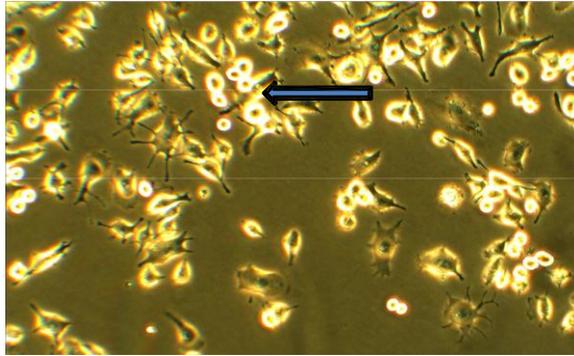
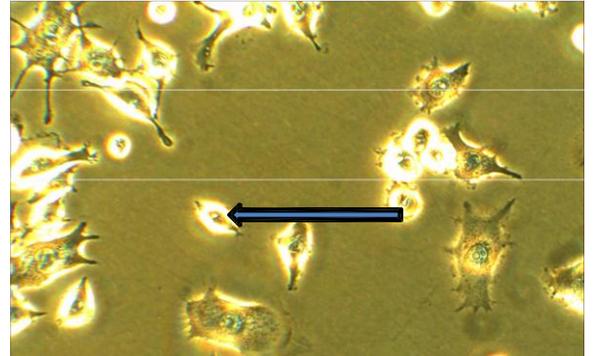


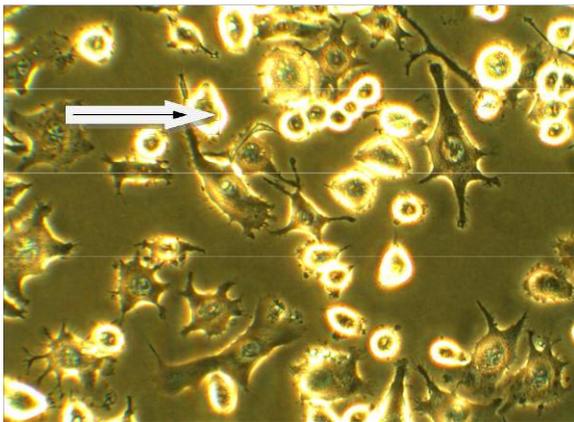
Figure 23. Effets de la baicaline, de l'extrait brut et des fractions d'*E. africana* sur la viabilité des cellules N9. EF indique les numéros des fractions d'*Entada africana* (EF1: CH₂CL₂, EF2: CH₂CL₂/MeOH 5%, EF3: CH₂CL₂/MeOH 10%, EF4: CH₂CL₂/MeOH 25%, EF5 : MeOH). **(A).** Les cellules N9 (1x10⁵cell/ml) ont été incubées avec les concentrations indiquées d'*E. africana* et de la baicaline (5 µg/ml) en présence des LPS 1µg/ml pendant 24h. La viabilité cellulaire a ensuite été déterminée par le test au MTT. **(B).** Les cellules N9 (1x10⁵cell/ml) ont été incubées avec les fractions d'*E. africana* à la concentration fixe de 100µg/ml en présence des LPS 1µg/ml pendant 24h. La viabilité cellulaire a par la suite été déterminée par le test au MTT comme décrit dans la section Matériel and Méthodes.



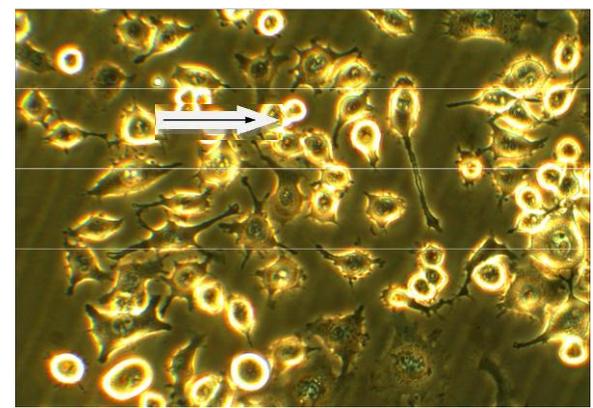
DMSO



Entada africana 100µg/ml, 24h



Entada africana + LPS, 24h



Entada africana + LPS, 48h

Figure. 24. Effet d' *Entada africana* sur la viabilité des cellules N9 induites ou non par les LPS (1µg/ml) pendant 24 et 48h. Les images des cellules sont obtenues en utilisant un microscope à inversion couplé à une vidéo-caméra. Les flèches indiquent les cellules observées au microscope. Grossissement x 40.

III-2-2 Effet des extraits et des fractions d'*Entada africana* sur la production de NO

Les effets des fractions et de l'extrait brut d'*E. africana* sur la production de NO induite par les LPS ont été investigués en mesurant l'accumulation de nitrite dans le milieu de culture, en utilisant la réaction de Griess. Après le traitement par les LPS (1µg/ml) pendant 24h, la concentration de nitrite dans le milieu de culture s'est accrue de 4 fois. Lorsque les cellules N9 ont été traitées avec différentes concentrations des composés concomitamment avec les LPS (1µg/ml) pendant 24h, une inhibition significative ($P < 0.001$) et dose-dépendante de la production de NO a été détectée en présence de l'extrait brut et des fractions d'*E. africana* (Fig.25). Les valeurs des IC_{50} obtenues sont 88.75, 20.25, 25.6, 75 et 38.43 µg/ml respectivement pour l'extrait brut et les fractions Ea (5, 10, 25 et Meth).

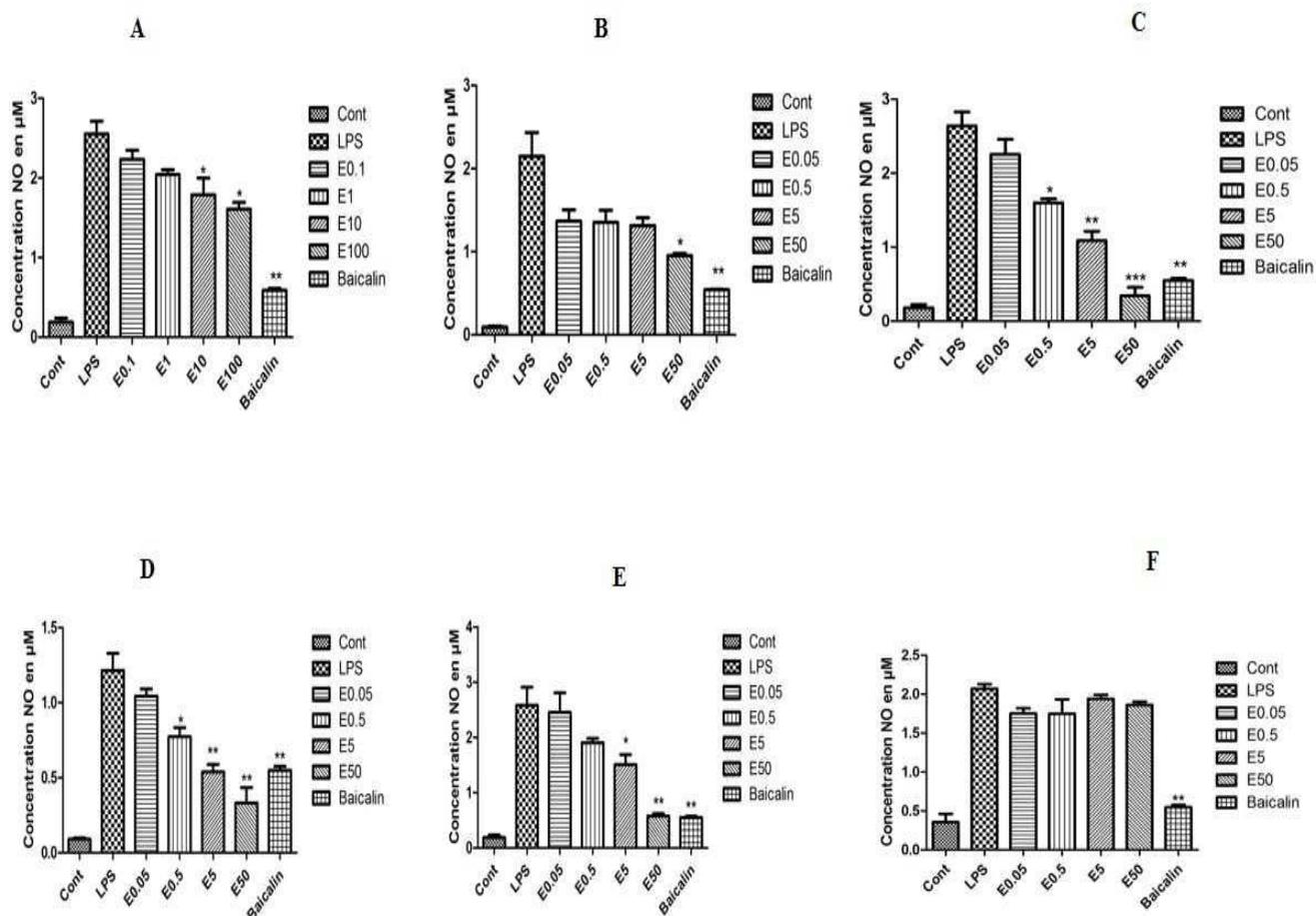


Figure 25. Inhibition de la production de NO induite par les LPS par l'extrait brut et les fractions d'*E. africana*. **A:** Extrait brut, **B:** Fraction au CH_2Cl_2 , **C:** Fraction au $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 5%, **D:** Fraction au $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10%, **E:** Fraction au $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 25% **F:** Fraction au MeOH. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ et *** $P < 0.001$ en comparaison avec le groupe traité au LPS.

Tableau 12: IC₅₀ des différentes fractions et de la baicaline en µg/ml et % d'inhibition du NO à 50 µg/ml.

Numéro de la fraction	IC ₅₀ en µg/ml	% Inhibition à 50 µg/ml
1- EaChl	Nc	
2- Ea5	20.25	87.07
3- Ea10	25.6	69.23
4- Ea25	75	51.68
5- EaMet	38.43	64.82
Baicaline		70.85

NC : Non calculée

III-2.3 Effet de la fraction Ea5 sur la production de H₂O₂ intracellulaire

Nous avons évalué la capacité de la fraction active d'*Entada africana* à moduler la production intracellulaire de ROS en utilisant les cellules N9. Comme indiqué dans la figure 26 ci-dessous, Ea5 n'exerce aucun effet significatif sur la production intracellulaire de ROS par les cellules N9.

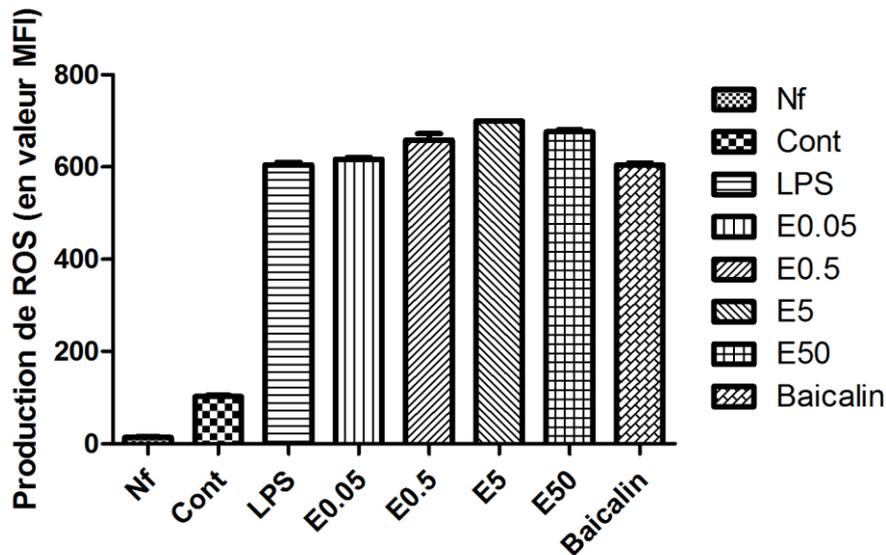


Figure 26. Effet de la fraction $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 5% d'*E. africana* sur la production de ROS par les cellules N9 traitées par les LPS (5×10^5 cell/ml). Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations d'*E. africana* et de la baicaline en présence ou en absence de LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) pendant 30 min. Le niveau de ROS généré a été déterminé par cytométrie de flux.

III.2.4 Effet de la fraction Ea5 sur l'activité phagocytaire des cellules N9

L'activité phagocytaire des microglies a été étudiée en utilisant le FITC-dextran, en présence ou en absence de LPS. Ce test a permis d'évaluer l'effet des LPS sur l'activité phagocytaire des microglies. D'après la figure 27 ci-dessous, nous n'observons aucune augmentation de l'activité phagocytaire des cellules en présence de LPS (A). En absence de LPS (B) nous ne notons aucune augmentation significative de l'activité phagocytaires des microglies aux concentrations testées et avec la baicaline.

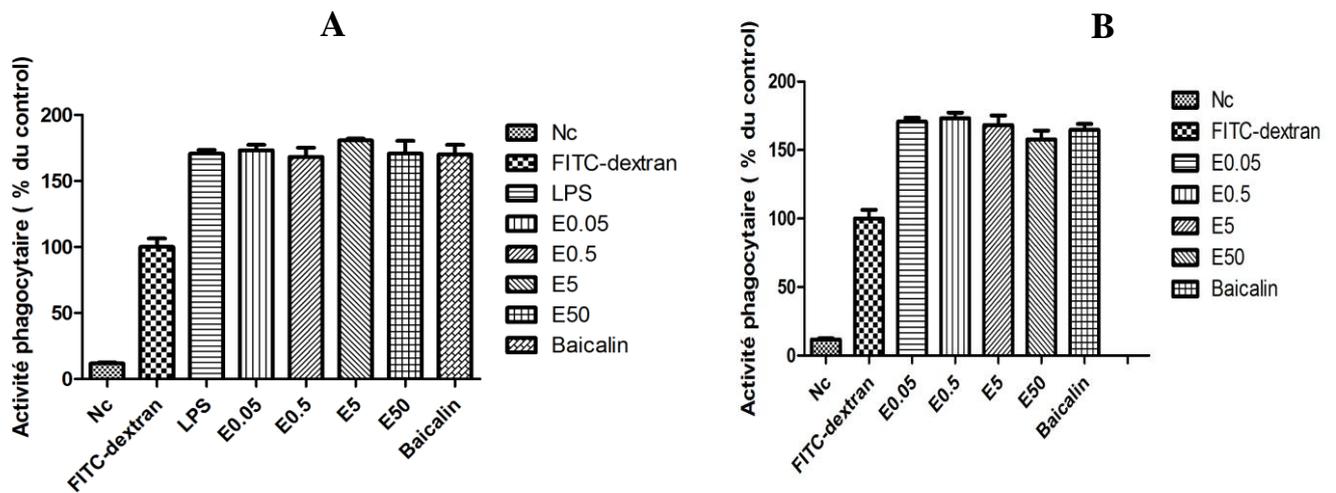


Figure 27. Effet d'Ea5 sur l'activité phagocytaire des cellules N9 à la suite d'une exposition aux LPS. (A) les cellules N9 ($2 \cdot 10^6$ cell/ml), prétraitées avec Ea5 (0 ; 0.05 ; 0.5 ; 5 et 50 µg/ml) et la baicaline (5 µg/ml), ont été stimulées avec du FITC-dextran (1mg/ml) en présence (A) ou en absence de LPS (1 µg/ml) pendant 6h. L'activité phagocytaire a été déterminée par cytométrie de flux.

III-2.5 Effet de la fraction Ea5 sur l'expression du mRNA des cytokines pro-inflammatoires

Nous avons cherché à savoir si Ea5 et la Baicaline suppriment l'expression des mRNAs de cytokines pro-inflammatoires telles les IL6, IL1β et TNFα dans des cellules N9 stimulées par les LPS. Pour ce faire, les cellules N9 ont été incubées avec Ea5 et la baicalin en présence ou en absence de LPS pendant 24h, et l'expression des mRNA des cytokines a été évaluée. Comme indique dans la figure 28, 1 µg/ml de LPS accroît significativement les expressions des mRNA des cytokines TNF alpha, IL1-β et IL-6 dans les cellules N9. Ea5 a inhibé de façon significative l'expression des mRNA des cytokines induit par les LPS. *E. africana* a significativement inhibé l'expression du mRNA de l'IL6 a 50 µg/ml ($P < 0.001$). Aucune inhibition significative n'a été obtenue avec la baicaline aux concentrations testées. Une inhibition significative de l'expression de l'IL-1β a été obtenue avec Ea5 a toutes les concentrations testées ($P < 0.001$). Le même effet a

été observé avec la baicaline. L'expression du mRNA du TNF α a significativement été réduit à toutes les concentrations testées ($P < 0.05$), mais aucun effet significatif sur la réduction de l'expression du mRNA de la TNF α n'a été obtenu avec la baicaline.

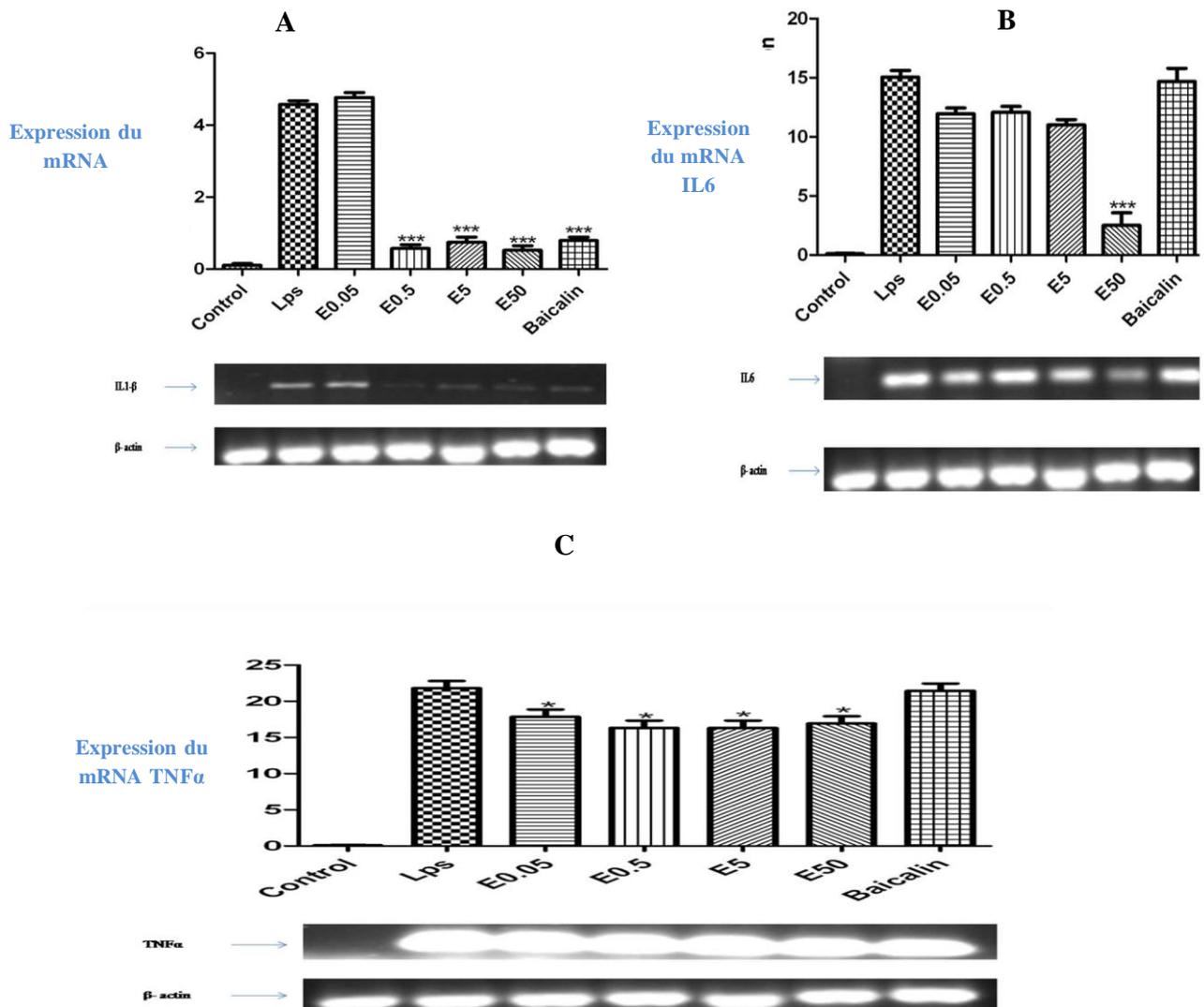


Figure 28. Effet de la fraction au CH₂Cl₂/ MeOH 5% d'*E. africana* (Ea5) sur l'expression des cytokines proinflammatoires sur les cellules N9 induites par les LPS. Les cellules N9 ont été prétraitées avec différentes concentrations d'Ea5 et ou la baicaline, avec ou sans LPS pour une

période de stimulation de 24h. Les RNAs totaux ont été isolés, et les niveaux d'expression des mRNA des cytokines IL1 β , TNF α , et IL6 ont été mesurés par RT-PCR. L'expression de la β -actin a été utilisée comme control interne. A. IL6, B. IL1 β , C. TNF α . * $P < 0.05$, et *** $P < 0.001$ par comparaison au groupe traité par les LPS.

III-2.6 Effet de la fraction Ea5 sur l'expression du mRNA de l'inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)

Nous avons cherché à savoir si la production du NO par les cellules en culture était directement liée à une expression du mRNA de l'iNOS, et ceci au moyen d'une RT-PCR. Comme présenté (figure 29), 1 μ g/ml de LPS accroît significativement les niveaux d'expression du mRNA de l'iNOS dans les cellules en question après 24 h de traitement. Ea5 a significativement réduit l'expression du mRNA de l'iNOS à 50 μ g/ml ($P < 0.01$). Une inhibition de l'iNOS a également été observée avec la baicaline à 5 μ g/ml ($P < 0.05$).

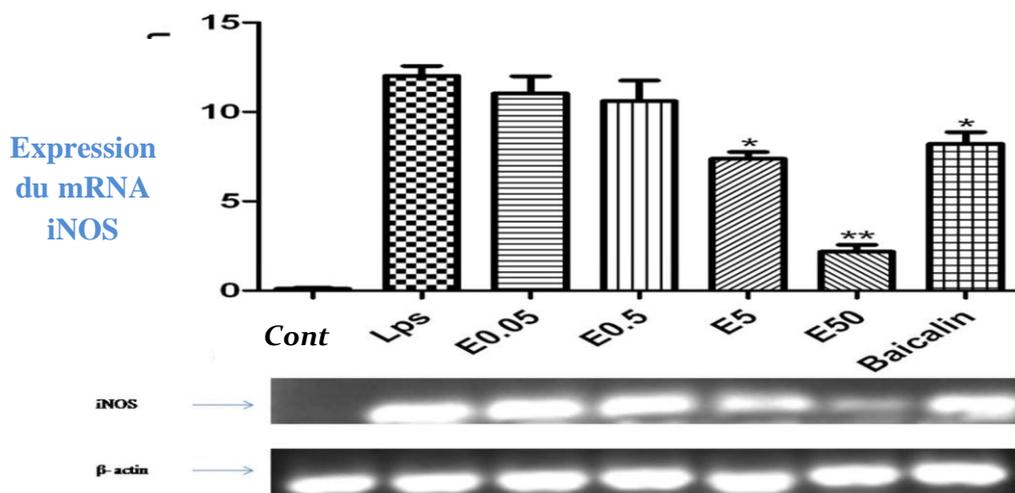


Figure 29. *E. africana* et la baicaline réduisent l'expression du gène de l' iNOS induit par le traitement des cellules avec les LPS. Les cellules N9 ont été incubées avec ou sans LPS 1 μ g/ml ensemble avec les concentrations indiquées d'extrait ou de Baicalin. Après 24 h, l'expression du

mRNA de l'iNOS a été quantifiée par RT-PCR.* $P < 0.05$ et ** $P < 0.01$ en comparaison au groupe traité au LPS.

III-2.7 Effet de la fraction Ea5 sur l'activité de la p38 MAP Kinase

Les MAPKs constituent une famille spécifique de serine/thréonine kinases qui phosphorylent les substrats cibles, contrôlant ainsi d'importantes fonctions cellulaires telles que l'expression des gènes (Downs *et al.*, 2013). Ea5 et la baicaline ont été testés pour leur habilité à inhiber la p38MAPK Kinase. Ceci a été évalué en utilisant un test p38 α ELISA contenant du BSA (0.01%) dans le tampon kinase. Dans notre expérience, l'inhibiteur de la p38 MAPK SB203580 ($IC_{50} = 0.048 \pm 0.01 \mu M$) a été utilisé comme composé de référence pour le test de p38 α kinase. Ea5 a présente un effet inhibiteur sur l'enzyme dans la gamme de concentrations testée (0.1 to 100 $\mu g/ml$). La baicaline a inhibé l'activité de la p38 MAPK Kinase à près de 80 % (Fig.30).

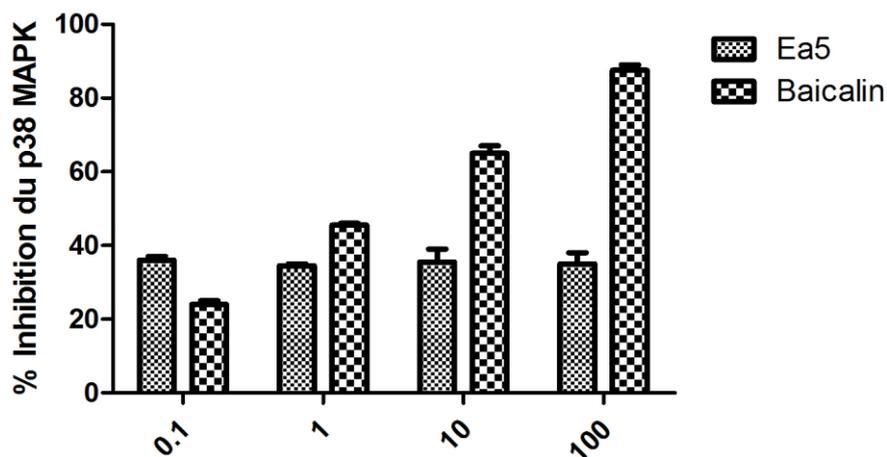


Figure 30. Effet d'*E. africana* et de la baicaline sur l'inhibition de l'activité de la p38 MAPK.

Le potentiel inhibiteur de la fraction et de la baicalin ont été évalués en utilisant un test ELISA contenant du BSA (0.01%) dans le tampon kinase. Le SB203580 a été utilisé comme composé de référence.

III-2.8 Effet de la fraction Ea5 sur l'expression de la protéine p42/44 MAPKs

La fraction Ea5 a été testée pour sa capacité à inhiber l'expression de la protéine p42/44 MAPKs dans les cellules N9. Les cellules ont été traitées par différentes concentrations de l'extrait et de la baicaline. Les protéines cellulaires ont par la suite été isolées et séparées par SDS PAGE. La détection de la protéine cible sur la membrane de nitrocellulose s'est faite en utilisant l'anticorps spécifique de cette protéine. La détection de la protéine cible a été très faible notamment pour ce qui est du contrôle et des concentrations d'Ea5.

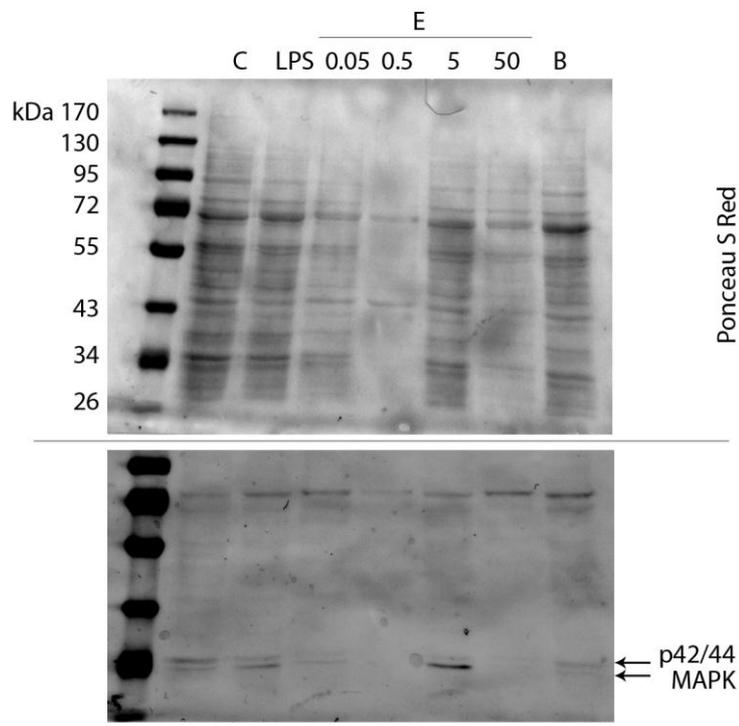


Figure 31: Détection de la p42/44 MAPK dans les microglies traitées par Ea5 et la baicaline. Les macrophages ont été traités par différentes concentrations de l'extrait (Ea5) et de la baicaline. Les protéines ont par la suite été isolées et séparées par SDS PAGE.

III.2.9 Discussion partielle

L'inflammation joue un rôle important dans la pathologie des maladies neurodégénératives (Hjorth et Freund-Levi, 2012). En particulier, la neuroinflammation avec une activation prolongée des microglies entraîne une activation de ces cellules et une production accrue de médiateurs proinflammatoires et des cytokines (Takanohashi *et al.*, 2006) contribuant de ce fait au dysfonctionnement neuronal et à la mort des neurones. Ainsi, les inhibiteurs de ces molécules inflammatoires sont considérés comme médicaments candidats pour l'allègement de la progression des maladies neurodégénératives causées par l'activation des microglies. L'expression de l'iNOS et la production excessive de NO sont considérés comme jouant un rôle significatif dans la pathogénicité de plusieurs de ces maladies. De ce fait, la forte production de NO par les microglies contribuerait à la complication de la maladie d'Alzheimer (Dhanapal *et al.*, 2012) et la maladie de Parkinson (Kiyota *et al.*, 2012). L'inhibition de l'expression de l'iNOS par les microglies pourrait être une manière intéressante de prévenir de nombreuses maladies associées à une production excessive de NO.

Dans cette étude, nous avons exploré pour la première fois l'expression des cytokines proinflammatoires et du mRNA de l'iNOS dans les microglies *in vitro*. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus avec la baicaline, un flavonoïde anti-inflammatoire dont l'activité a déjà été démontrée. En plus, nous avons étudié la capacité d'*E. africana* et de la baicaline à inhiber l'activité de l'enzyme p38 MAPK Kinase. Nous avons constaté que l'incubation des cellules N9 avec les LPS (1µg/ml) entraîne une augmentation du NO dans le milieu de culture cellulaire accompagné d'une induction de l'expression du mRNA de l'iNOS (Fig.29). L'activité la plus importante a été obtenue avec *E. africana* à 50µg/ml, en comparaison à la Baicaline. Nos résultats suggèrent que l'extrait brut et les fractions d'*E. africana* suppriment fortement la production de NO dans les microglies stimulées par les LPS. Ea5 supprime l'expression du mRNA des cytokines proinflammatoires les plus importantes telles l'IL6, IL-1β et le TNFα (Fig.28). Le nombre de microglies actives viables n'a pas été significativement altéré par l'extrait brut et les fractions de la plante comme indiqué par le test au MTT, indiquant ainsi que l'inhibition de la synthèse de NO par *E. africana* n'est pas due à un effet cytotoxique.

Les microglies sont les macrophages résidents du cerveau. Une fois activés par un agent pathogène, les microglies sécrètent des molécules proinflammatoires telles le NO, le superoxide, et des cytokines inflammatoires (Varsanyi *et al.*, 2013). Plusieurs rapports ont démontré que

l'expression de l'iNOS, l'enzyme responsable de la production de NO, est régulée par plusieurs composés dérivant des plantes médicinales (Shen *et al.*, 2001). En plus, les microglies produisent des cytokines proinflammatoires qui sont reconnues comme contribuant à l'induction et à la potentialisation de l'inflammation dans le cerveau (Mao-Ying *et al.*, 2012). Le mécanisme moléculaire par lequel *E. africana* médie la régulation des réponses inflammatoires cellulaires n'a pas encore été démontré. *E. africana* a été reporté comme un antioxydant potentiel et comme induisant l'expression de la hemeoxygenase-1, comme la plus-part des composés antioxydants (Tchacondo *et al.*, 2011). Les données présentées ici suggèrent que *E. africana* pourrait efficacement protéger les cellules immunitaires contre l'inflammation causée par la production de certaines cytokines proinflammatoires et la production excessive de NO.

Les cytokines produites par les microglies sont connues comme étant associées au dépôt de plaques amyloïdes dans le cerveau (Kopec et Carroll, 1998). Les LPS génèrent plusieurs molécules cytotoxiques (TNF α , ROS et NO) qui ont un impact sérieux sur la viabilité des cellules normales. Bien que le mécanisme moléculaire par lequel *E. africana* inhibe la production du NO et l'expression du mRNA des cytokines pro-inflammatoires ne soit pas encore élucidé, *E. africana* pourrait moduler de nombreux signaux cellulaires dans les microglies. De nos jours, plusieurs voies de régulation de signaux cellulaires ont été identifiées. L'une de ces voies est celle médiée par le NF- κ B, qui est une voie qui contrôle l'expression de plusieurs marqueurs protéiques tels que les cytokines et les glycoprotéines de surface. L'effet anti-inflammatoire de plusieurs composés dérivés des plantes médicinales a aussi été révélé comme se déroulant via une inhibition des voies de régulation du signal telles que les MAPKs, PI3K/Akt, et Jak/STAT (Shin *et al.*, 2013).

Vu les propriétés antioxydantes d'*E. africana* (Tchacondo *et al.*, 2011), nous présumons que l'effet suppresseur de cet extrait de plante et de ses fractions sur la production de NO pourrait être lié à ses propriétés antioxydantes et à la suppression de l'expression de l'iNOS au niveau transcriptionnel.

Le p38MAPK joue un rôle central dans la réponse immunitaire contre les attaques des cytokines inflammatoires (Van den Blink *et al.*, 2002). Pour évaluer l'inhibition de ce signal cellulaire par *E. africana* et la baicaline, nous avons utilisé le test d'inhibition. Comme présenté dans la figure 30, *E. africana* a présenté une inhibition modérée de la p38 MAP Kinase. Une inhibition de 89% a plutôt été obtenue avec la baicaline. Ces résultats suggèrent qu'en dehors de la voie p38 MAP

Kinase, plusieurs autres signaux moléculaires pourraient contribuer aux effets bénéfiques d'*E. africana* contre la cytotoxicité induite par les LPS.

E. africana est utilisé en médecine traditionnelle africaine pour le traitement de plusieurs maladies. Toutes les parties de l'arbre sont utilisées incluant les écorces, les racines, les feuilles, et les fruits. Les principaux constituants sont les polyphénols (Tchacondo *et al.*, 2011) qui pourraient être responsables des effets observés, du fait que plusieurs de ces composés ont été reportés comme étant de bons anti-inflammatoires et immunomodulateurs (Shi *et al.*, 2010), (Woldu *et al.*, 2010), (Longpre *et al.*, 2008). Tout de même, la connaissance des signaux moléculaires impliqués dans l'activité d'*E. africana* sur les cellules immunitaires n'a pas été démontré. Ainsi, les effets d'Ea5 sur les signaux cellulaires activés à travers la stimulation par les LPS doivent continuer d'être investigués, ainsi que les composés présents dans cette fraction.

En sommaire de cette étude, nous avons démontré que *E. africana* supprime l'activation des microglies induite par les LPS en inhibant la production de NO et l'expression des mRNA de l'iNOS et celle des cytokines proinflammatoires comme le TNF α , IL6 et IL-1 β .

III.2.10 Conclusion partielle

En conclusion, la présente étude a révélé que le traitement des cellules N9 (induites par les LPS) par *E. africana* agit en supprimant la production des cytokines proinflammatoires telles que les TNF α , IL6 et l'IL1- β , de même que leur activité transcriptionnelle. Ceci suggère que *E. africana* pourrait avoir un potentiel effet thérapeutique pour le traitement des maladies neurodégénératives qui sont accompagnées par une activation des microglies.

III.3 Effet des extraits et sous fractions de *Khaya grandifoliola* sur la viabilité et la production d'Oxide nitrique par les cellules Raw 264.7 et N9

Introduction

La production excessive d'oxyde nitrique (NO) est responsable de plusieurs désordres pathologiques observés chez les humains, parmi lesquels la potentialisation de l'inflammation, la maladie d'Alzheimer et l'hypotension observée durant le choc septique. Les inhibiteurs de la production de NO pourraient être des composés prometteurs pour le traitement des maladies liées à une production exagérée de NO. Dans cette étude, nous avons préparé l'extrait au CH₂Cl₂/MeOH 1:1 V/V de *Khaya grandifoliola* et avec l'extrait brut obtenu, nous avons préparé 5 différentes fractions en utilisant la chromatographie flash. Les fractions obtenues ont été ensuite fractionnées par chromatographie de colonne sur gel de silice, pour obtenir 24 sous-fractions. En procédant par un fractionnement bio guidé (Figure 32), l'extrait brut, les fractions et les sous-fractions ont été évalués pour leurs activités inhibitrices vis-à-vis de la production du NO dans des macrophages et des microglies activés par les LPS. Parmi les 24 sous-fractions testées, 12 ont présenté un potentiel inhibiteur envers la production de NO de l'ordre de près de 25% à la concentration de 50 µg/ml avec les macrophages, et 13 avec les microglies à la même concentration. Les effets cytotoxiques de l'extrait brut, des fractions et des sous-fractions ont été déterminés par le test au MTT et la majorité des composés n'ont présenté aucune cytotoxicité sur les 2 lignées cellulaires à la concentration de 50 µg/ml. Ainsi, *Khaya grandifoliola* peut être considéré comme candidat prometteur pour la purification de composés bioactifs.

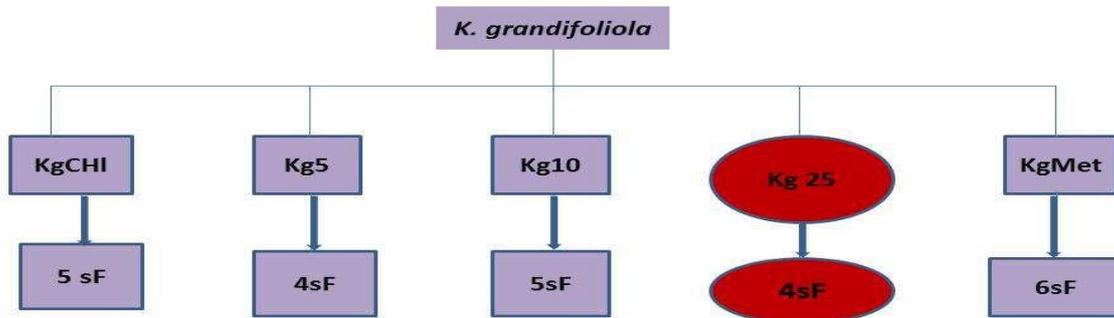


Figure 32: Fractionnement de *Khaya grandifoliola* et obtention de différentes sous fractions. L'extrait brut de *K.grandifoliola* a été fractionné, puis les différentes fractions ont été par la suite soumises à une chromatographie sur colonne pour l'obtention des différentes sous fractions.

III.3.1 Effet sur la viabilité cellulaire

La figure 33 représente l'effet de l'extrait brut et des fractions de *Khaya grandifoliola* sur la viabilité des cellules étudiées.

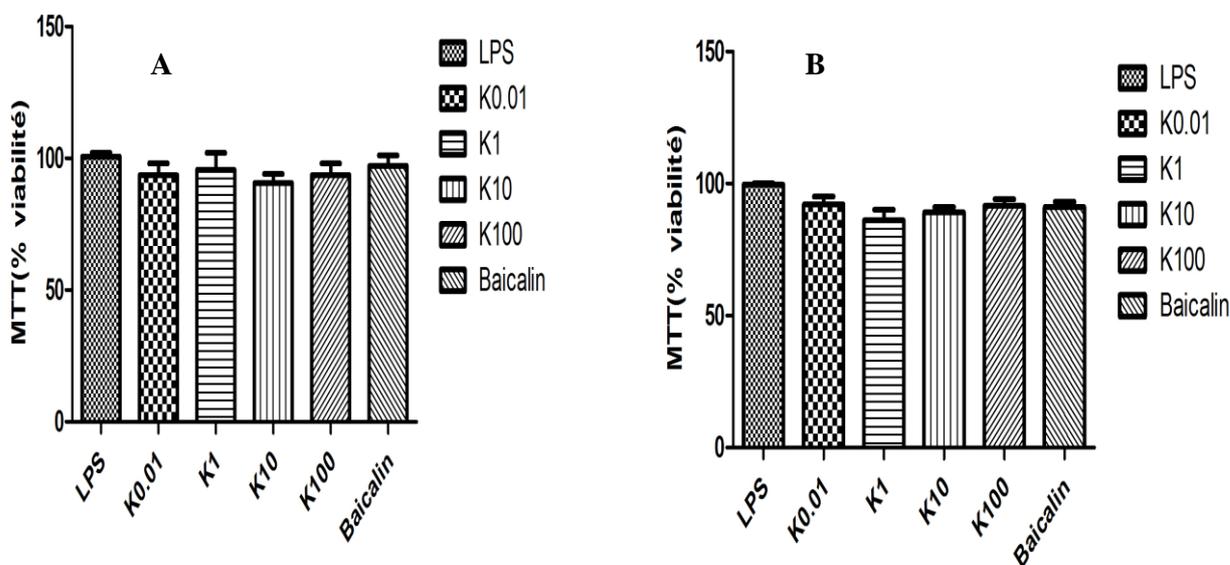


Figure.33. Effet de l'extrait brut de *K. grandifoliola* et des différentes fractions sur la viabilité des macrophages et des microglies induits par les LPS. A. Les cellules Raw 5.10⁵cell/ml ont été incubées avec les concentrations indiquées de KG, en présence de LPS 1µg/ml pendant 24h. La viabilité des cellules a été par la suite déterminée par le test au MTT comme indiqué dans la section Matériel et Méthodes. B. Les cellules N9 5.10⁵cell/ml ont été incubées avec les différentes concentrations de KG, en présence de LPS 1µg/ml pendant 24h. . La viabilité des cellules a été par la suite déterminée par le test au MTT comme indiqué dans la section Matériel et Méthodes.

III.3.2 Effet des fractions de *K.grandifoliola* sur la production de NO dans les cellules Raw et N9

Les figures et tableaux ci-dessous représentent l'effet des fractions et sous-fractions de *Khaya grandifoliola* sur la production de NO induite par les LPS. Les pourcentages d'inhibition sont calculés par rapport à la production de NO stimulée par les LPS (90% d'activation par rapport au témoin non traité).

Tableau 13. Inhibition de l'Oxyde Nitrique et cytotoxicité de l'extrait brut et des fractions de *Khaya grandifoliola* sur les cellules Raw 264.7 testées à la concentration de 50µg/ml.

Composé	Inhibition NO (%)	Viabilité cellulaire (%)
Extrait brut	49.67	98.45 ± 0.0345
Fraction CH ₂ CL ₂	Pas d' inhibition	87.34 ±0.678
Fraction CH ₂ CL ₂ /MeOH5%	47.54	100.09 ±0.0234
Fraction CH ₂ CL ₂ /MeOH10%	70.44	92.56 ±2.456
Fraction 4 CH ₂ CL ₂ /MeOH 25%	69.12	96.67 ±0.945
Fraction MeOH	21.86	106.45 ±1.456

Tableau 14. Inhibition de l'Oxyde Nitrique et cytotoxicité de l'extrait brut et des fractions de *Khaya grandifoliola* sur les cellules N9.

Composé	Inhibition NO (%)	Viabilité cellulaire (%)
Extrait brut	59.45	101.45±1.345
Fraction CH ₂ CL ₂	58.02	91.25±2.543
Fraction CH ₂ CL ₂ /MeOH5%	62.9	89.67±0.345
Fraction CH ₂ CL ₂ /MeOH10%	76.40	93.57±0.234
Fraction CH ₂ CL ₂ /MeOH 25%	80	81.78±0.432
Fraction MeOH	61.49	105.69±0.230

Tableau 15. Inhibition du NO et cytotoxicité des sous fractions de *Khaya grandifoliola* sur les cellules Raw 264.7. Les sous fractions issues de la chromatographie sur colonne ont été regroupées en fonction de leur profil en CCM. Fraction CH₂CL₂ (sous-fractions 2-49), Fraction CH₂CL₂/MeOH 5% (sous-fractions 53-75), Fraction CH₂CL₂/MeOH 10% (sous-fractions 76-89), Fraction CH₂CL₂/MeOH 25% (sous-fractions 90-121), Fraction MeOH (sous-fractions 134).

Numéro de la sous-fraction	Inhibition NO (%)	Viabilité cellulaire (%)
Sous fraction 1 (2-7)	41.86	102.45±0.890
Sous fraction 2 (8-13)	11.31	98.56±1.456
Sous fraction 3 (17 -21)	52.76	86.56±2.345
Sous fraction 4 (29-33)	30.26	94.67±1.367
Sous fraction 5 (34-49)	59.56	87.56±0.367
Sous fraction 4 (41-53)	73.23	91.45±0.456
Sous fraction 6 (54-63)	78.02	103.56±0.654
Sous fraction 7 (64-67)	81.13	102.78±0.567
Sous fraction 8 (70)	80	91.00±0.678
Sous fraction 9 (71)	70.97	89.89±0.321
Sous fraction 10 (72)	36.87	107.68±0.989
Sous fraction 11 (73-75)	57.53	104.34±0.456
Sous fraction 12 (76)	56.78	96.34±0.678
Sous fraction 13(77)	68.89	91.89±0.567
Sous fraction 14(78)	84.23	101.45±0.112
Sous fraction 15 (79)	37.96	85.56±0.239
Sous fraction 16 (80-85)	27.09	80.34±0.456
Sous fraction 17 (86-89)	66.43	84.56±1.367

Sous fraction 18 (90-102)	75.60	103.25±2.666
Sous fraction 19 (103-111)	65	96.67±1.432
Sous fraction 20 (112-120)	46.03	90.02±0.234
Sous fraction 21 (121)	64.35	89.45±0.459
Sous fraction 22 (134)	45.67	78.90±0.444
Sous fraction 23 (14-16)	78.89	100.34±0.567
Sous fraction 24 (22-28)	76.36	96.81±0.666

Tableau 16. Inhibition de l'Oxide Nitrique et cytotoxicité des sous fractions de *Khaya grandifoliola* sur les cellules N9. Les sous fractions issus de la chromatographie sur colonne ont été regroupées en fonction de leur profile en CCM. Fraction CH₂CL₂ (sous-fractions 2-49), Fraction CH₂CL₂/MeOH 5% (sous-fractions 53-75), Fraction CH₂CL₂/MeOH 10% (sous-fractions 76-89), Fraction CH₂CL₂/MeOH 25% (sous-fractions 90-121), Fraction MeOH (sous-fractions 134).

Numéro de la sous fraction	Inhibition NO (%)	Viabilité cellulaire (%)
Sous fraction 1 (2-7)	61.05	87.42±1.234
Sous fraction 2 (29-33)	76.61	99.02±0.888
Sous fraction 3 (34-39)	75.57	96.60±1.346
Sous fraction 4 (40-43)	63.34	88.79±1.389
Sous fraction 5 (41-53)	75.77	103±0.666
Sous fraction 6 (54-63)	62.45	100.77±.549
Sous fraction 7 (64-67)	63.47	108.60±0.345
Sous fraction 8 (70)	54.56	103.78±1.002
Sous fraction 9 (71)	36	89.45±0.789
Sous fraction 10 (72)	52.51	102.45±0.348
Sous fraction 11 (73-75)	41.71	98±0.678
Sous fraction 12 (76)	58.18	111.21±1.777
Sous fraction 13 (77)	25.89	86.28±0.569
Sous fraction 14 (78)	86.78	102.46±1.600
Sous fraction 15 (79)	7.63	97.34±0.777
Sous fraction 16 (80-85)	26.68	100.02±0.985
Sous fraction 17 (86-89)	32.35	81.64±0.665

Sous fraction 18 (90-102)	85	89.45±0.554
Sous fraction 19 (103-111)	70	102.12±0.123
Sous fraction 20 (112-120)	65	92.35±0.990
Sous fraction 21 (121)	70.78	89.56±0.780
Sous fraction 22 (131-134)	48.45	81.34±0.951

(Les données entre parenthèses représentent les numéros des sous-fractions rassemblées entre elles en fonction du profil CCM).

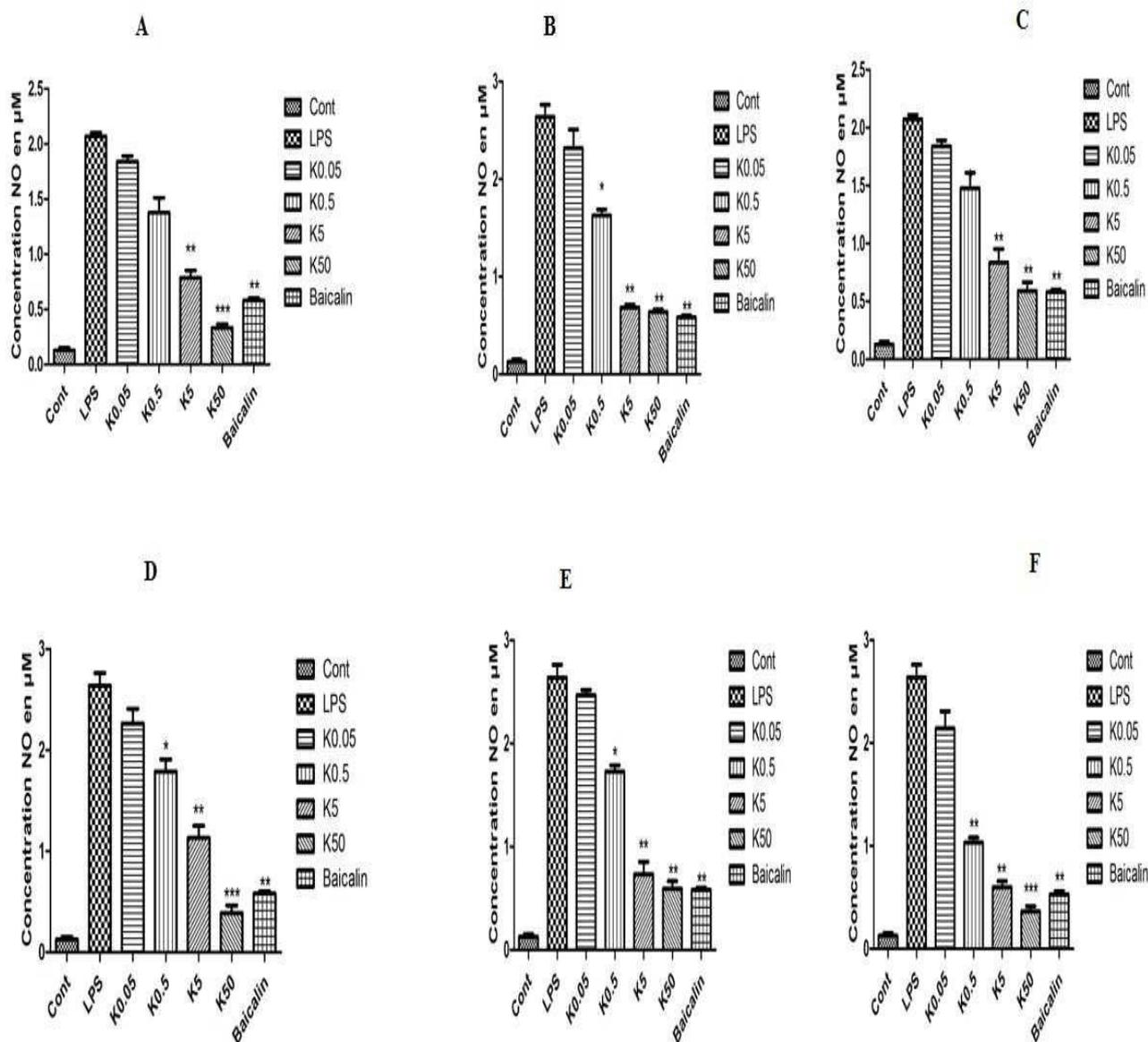


Figure 34. Effet des sous fractions 78, 64-67, 70 et de la fraction 25 et sous fractions 90-102 et 78 de *K. grandifoliola* sur la production de NO. Les cellules Raw ont été cultivées dans du milieu complet RPMI 1640 contenant de la pénicilline, la streptomycine et 10 FCS à 37°C et 5% CO₂. 5.10⁵ cellules sont introduites dans des plaques de culture cellulaire de 24 puits et cultivées pendant 24h. Par la suite, les cellules ont été récoltées et centrifugées, et les surnageants collectés ont été utilisés pour l'analyse de la concentration de NO par le test de Griess. **A. Fraction 78, B. Fraction 64-67, C. Fraction 70. D. Sous fraction 78, E. Sous fraction 90-102, F. Fraction 25.**

Concentration de la baicaline testée (5µg/ml). *P<0.05, **P<0.01, et ***p<0.01 en comparaison au groupe traité par les LPS.

Tableau 17. Valeurs des IC50 en µg/ml pour les cellules Raw 264.7 pour la production de NO.

Composé	IC ₅₀ en µg/ml
SF64-67(Fraction CH ₂ CL ₂ /MeOH 5%)	8.571
SF70 (Fraction CH ₂ CL ₂ /MeOH 10%)	1.340
SF78 (Fraction CH ₂ CL ₂ /MeOH 10%)	16.64

Tableau 18. Valeurs des IC50 en µg/ml pour les cellules N9

Composé	IC ₅₀ en µg/ml
F25%	8.545
SF90-102	19.61
SF70	29.63

Il en ressort de la série de tests ci-dessus que l'extrait brut et les fractions de *K. grandifoliola* n'ont aucun effet sur la viabilité des cellules Raw et N9 (Tableaux 13 et 14). On observe également que les fractions 10% et 25% présentent les meilleurs pourcentages d'inhibition du NO dans les deux types de cellules. Les différentes fractions ont par la suite été soumises à une chromatographie sur colonne et les meilleurs pourcentage d'inhibition du NO ont été obtenues avec les sous-fractions 7, 8 et 14 pour les cellules Raw et 14, 18 pour les cellules N9 (Tableaux 15 et 16). Les IC50 des

meilleures sous-fractions ont été calculées et il en ressort que les sous-fractions F25% (N9) et SF70 (Raw) sont les meilleures (Tableaux 17 et 18). La figure 34 montre que les sous-fractions 78, 70 et F25 inhibent significativement mieux la production du NO en comparaison à la baicaline.

III-3.3 Effet des sous fractions 70 et KF25 de *K. grandifoliola* sur l'expression de l'iNOS et des cytokines pro-inflammatoires

III-3.3.1 Effets des fractions et sous fraction 70 et KF25 sur l'expression de l'iNOS par les cellules N9

Au moyen d'une RT-PCR, nous avons étudié l'inhibition de la production de NO par l'iNOS. Comme indiqué dans la figure 35 ci-dessous, 1 μ g/ml de LPS accroît significativement l'expression du mRNA de l'iNOS dans ces cellules après 24 h de traitement. Il est généralement admis que l'activation des macrophages par les LPS se déroule à travers la fixation des LPS au Toll-like receptor 4. KSF 70 a significativement réduit l'expression du mRNA de l'iNOS à 50 μ g/ml ($P < 0.001$). Une inhibition de l'iNOS a également été obtenue avec la baicaline ($P < 0.01$). Ces résultats indiquent que la réduction de l'expression de l'iNOS par KSF70 et la baicaline seraient responsable de l'inhibition de la production de NO observée dans cette étude.

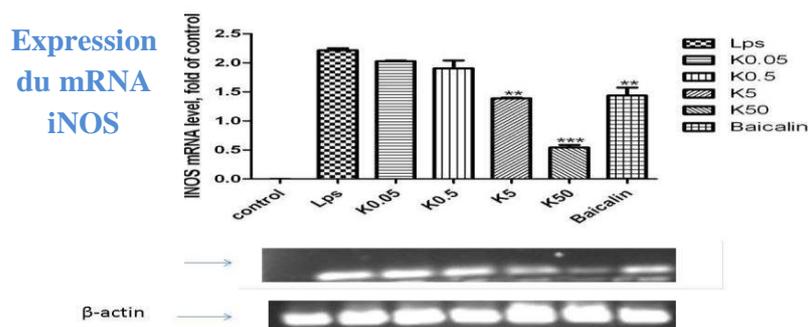


Figure. 35. La sous fraction 70 de *K. grandifoliola* réduit l'expression du gène de l'iNOS induite par les LPS dans les cellules N9. Les microglies ont été incubées avec ou sans les LPS

(1µg/ml) concomitamment avec les différentes concentrations de *K. grandifoliola*. Après 24 h d'incubation, le mRNA de l'iNOS a été quantifié par RT-PCR. **P<0.01, et ***P<0.001 en comparaison au groupe traité par les LPS.

Dans le souci de savoir si la production de NO par les cellules traitées avec la fraction 25 de *K. grandifoliola* est directement liée à une activation de l'expression du mRNA de l'iNOS, nous avons mesuré l'expression du mRNA de cette enzyme au moyen d'une RT-PCR. Comme indiqué dans la figure 36 ci-dessous, 1µg/ml de LPS accroît significativement l'expression du mRNA de l'iNOS après 24h de traitement. Les cellules, une fois traitées par l'extrait et la baicaline, nous observons une inhibition significative de l'expression du mRNA de l'iNOS à toutes les concentrations testées ($P < 0.001$). Une inhibition de l'iNOS a également été observée avec la Baicalin ($p < 0.001$). Ces données indiquent que la fraction 25 de *K. grandifoliola* induit la réduction de l'expression de l'iNOS et cette induction serait responsable de l'inhibition de la production de NO observée.

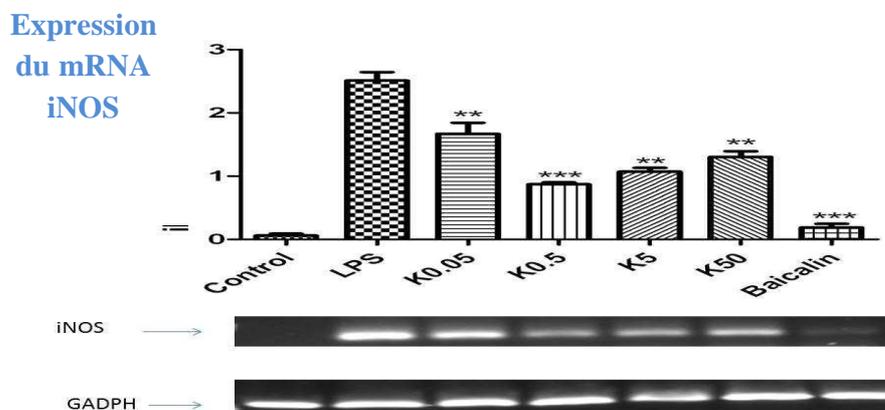


Figure. 36. La fraction 25 de *K. grandifoliola* réduit l'expression du gène de l'iNOS induite par les LPS dans les cellules N9. Les microglies ont été incubées avec ou sans les LPS (1µg/ml) concomitamment avec les différentes concentrations de *K. grandifoliola*. Après 24 h d'incubation,

le mRNA de l'iNOS a été quantifié par RT-PCR. ** $P < 0.01$, et *** $P < 0.001$ en comparaison au groupe traité par les LPS.

III-3.3.2 Effets des fractions et sous fraction 70 et KF25 sur l'expression des cytokines proinflammatoires par les cellules N9

Comme indiqué dans la figure 37 ci-dessous, 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS accroît les niveaux d'expression des mRNA des TNF α , IL1- β et IL-6 dans les cellules N9. KSF70 a significativement inhibé ($P < 0.01$) l'expression du mRNA de l'IL-1 β à 0.5, 5 et 50 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0.001$). KSF70 inhibe l'expression du mRNA du TNF α à 0.5, 5 et 50 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0.05$). Cependant, aucune inhibition significative n'a été obtenue avec KSF70 concernant l'inhibition du mRNA de l'IL6 (Figure 37). Ces résultats suggèrent que KSF70 et la baicaline induisent la suppression de la production des cytokines proinflammatoires dans des microglies activées notamment à travers une altération des niveaux de transcription du TNF α et d'IL1 β .

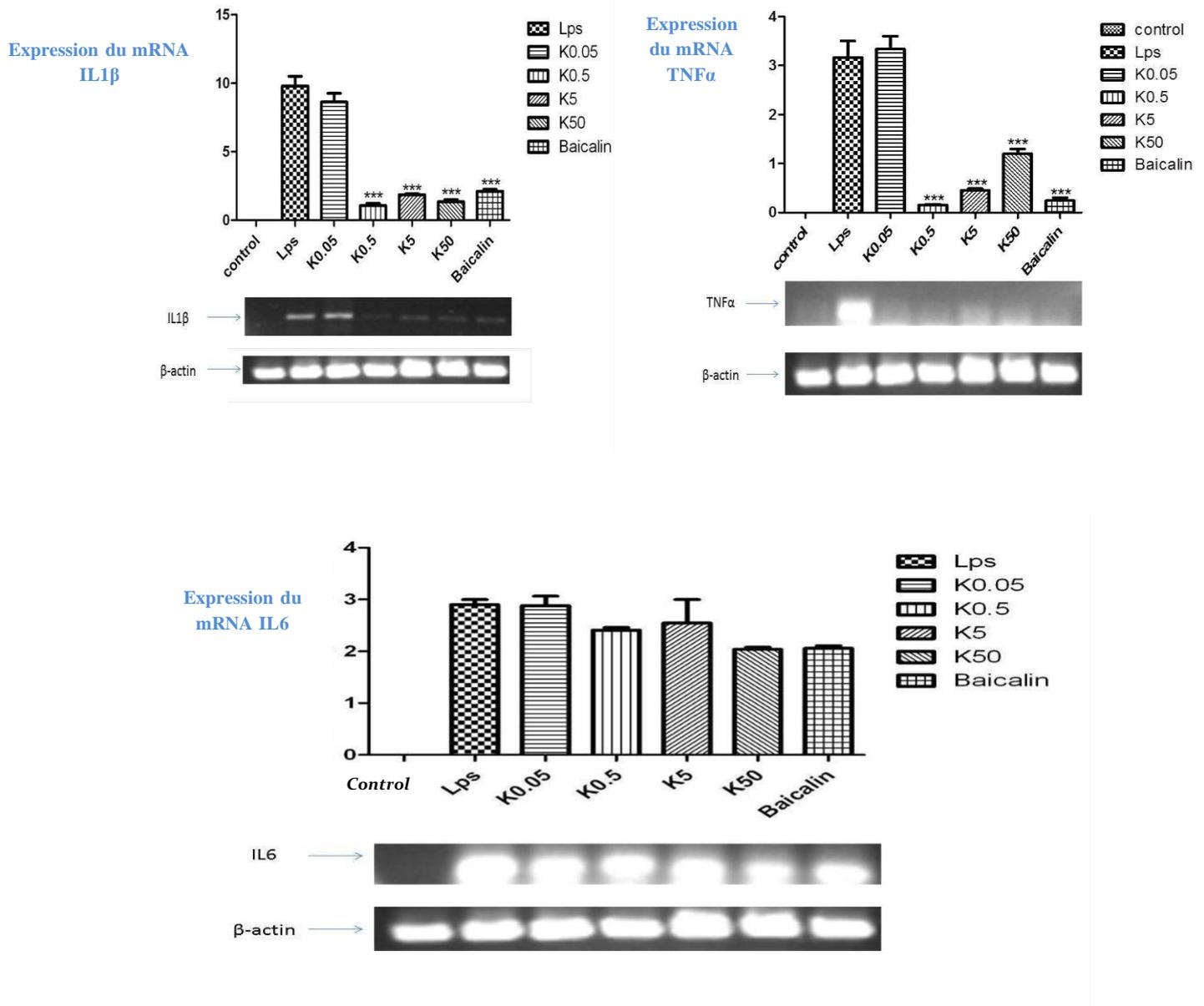


Figure 37. Effet de la sous fraction 70 de *K. grandifoliola* sur l'expression des mRNA de l'IL1 β , TNF α , et IL6 dans les microglies. Les cellules N9 ont été prétraitées avec différentes concentrations de KGf78, avec ou sans LPS pour une période de stimulation de 24h. Les RNAs totaux des cellules ont été isolés, et les niveaux de mRNA de l'IL1 β , TNF α , et IL6 ont été mesurés par RT-PCR. L'expression de la β -actin a été utilisée comme contrôle interne. *** $p < 0.001$ en comparaison au groupe traité par les LPS.

La fraction 25 de *K. grandifoliola* a été testée pour son effet sur l'expression des cytokines proinflammatoires par les cellules N9. Les cytokines investiguées sont le TNF α , l'IL6 et l'IFN α . La figure 38 ci-dessous montre les résultats de l'expression des mRNAs de ces cytokines par les cellules N9.

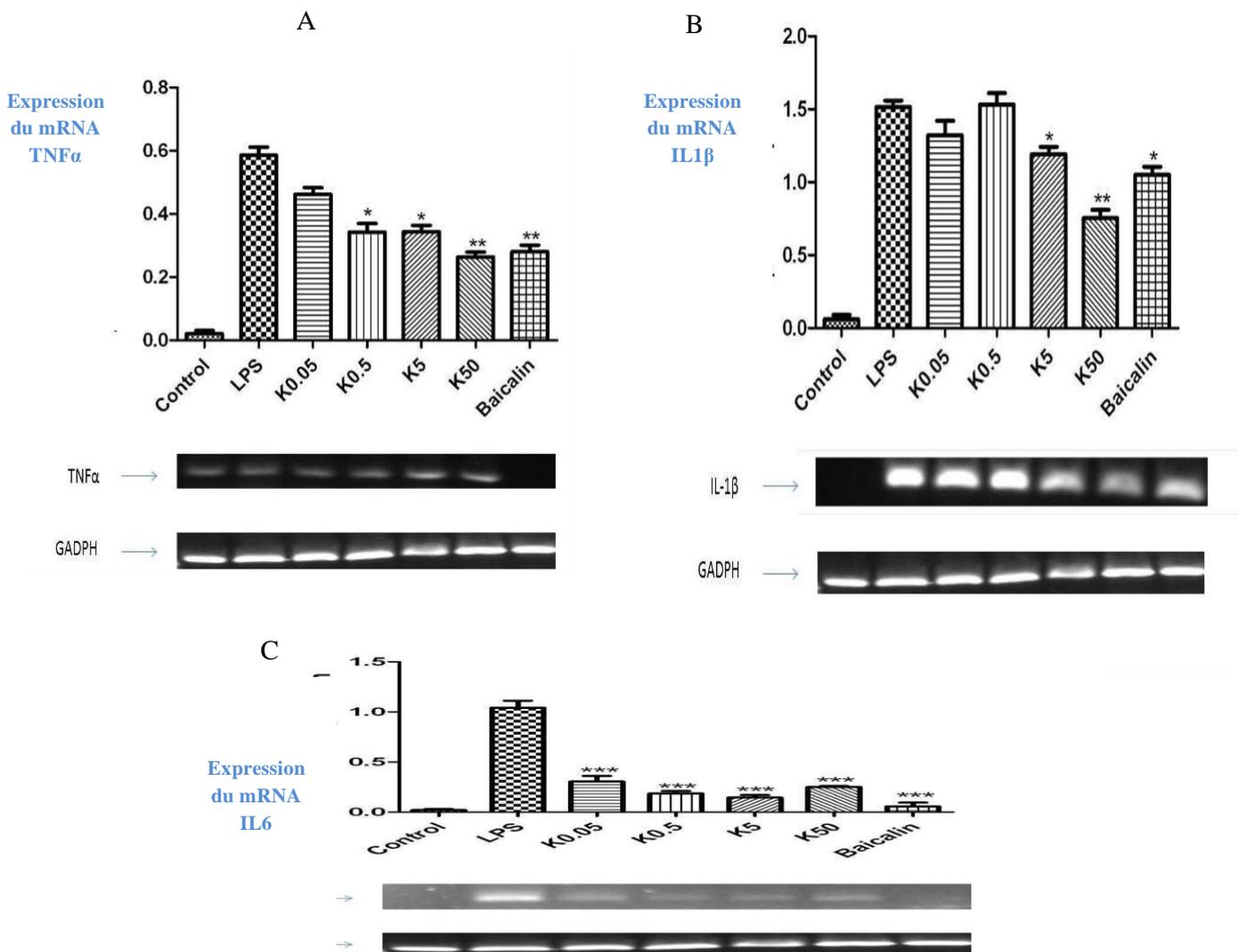


Figure 38. Effet de la fraction 25 de *K. grandifoliola* sur l'expression des mRNA de l'IL1 β , TNF α , et IL6 dans les microglies. Les cellules N9 ont été prétraitées avec différentes concentrations de KGF25, avec ou sans LPS pour une période de stimulation de 24h. Les RNAs

totaux des cellules ont été isolés, et les niveaux de mRNA de l'IL1 β , TNF α , et IL6 ont été mesurés par RT-PCR. L'expression de la β -actin a été utilisée comme contrôle interne. *P<0.05, **P<0.01, et ***P<0.001 en comparaison au groupe traité par les LPS.

III-3.3.3 Effet de la fraction 25 de *Khaya grandifoliola* sur l'expression de l'iNOS par les cellules Raw 264.7

En traitant les cellules par l'extrait et la baicaline, nous observons une inhibition significative de l'expression du mRNA de l'iNOS à toutes les concentrations testées (P< 0.001) (Figure 39). Une inhibition de l'iNOS a également été observée avec la baicaline (P< 0.001). Ces données indiquent que la fraction 25 de *K. grandifoliola* induit la réduction de l'expression de l'iNOS et cette induction serait responsable de l'inhibition de la production de NO observée.

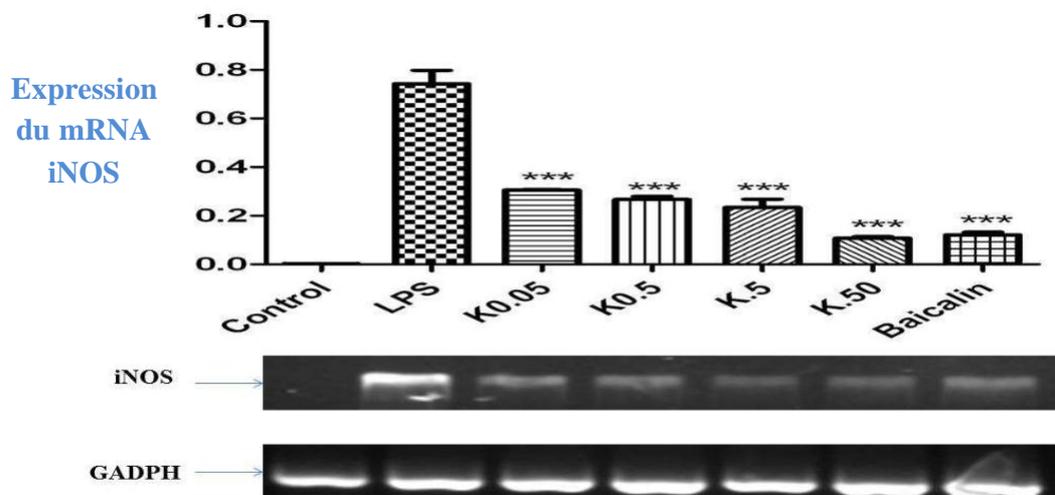


Figure. 39. La fraction 25 de *K. grandifoliola* réduit l'expression du gène de l'iNOS induite par les LPS dans les cellules Raw. Les macrophages ont été incubées avec ou sans les LPS (1 μ g/ml) concomitamment avec les différentes concentrations de *K. grandifoliola*. Après 24 h

d'incubation, le mRNA de l'iNOS a été quantifié par RT-PCR. *** $P < 0.01$ en comparaison au groupe traité par les LPS.

III-3.3.4 Effet de la fraction 25 de *Khaya grandifoliola* sur l'expression des gènes des cytokines proinflammatoires dans les cellules Raw 264.7

Nous avons en même temps évalué l'effet de la fraction 25 de *K. grandifoliola* sur l'expression des cytokines proinflammatoires sur les cellules Raw 264.7. Pour ce faire, les expressions des mRNAs de la TNF α et de l'IL6 ont été étudiées. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 40 ci-dessous. Nous observons que la fraction 25 de *K. grandifoliola* inhibe l'expression du mRNA du TNF α à toutes les concentrations testées ($P < 0.05$), le même résultat est observé pour ce qui est de la baicaline. Cependant, une meilleure inhibition de l'expression du mRNA de cette cytokine est obtenue avec cette fraction à la concentration de 0.05 μ g/ml ($P < 0.01$). Pour ce qui de l'expression de l'IL6, une inhibition significative de l'expression de cette cytokine a été obtenue avec la fraction et la baicaline à toutes les concentrations testées ($P < 0.001$).

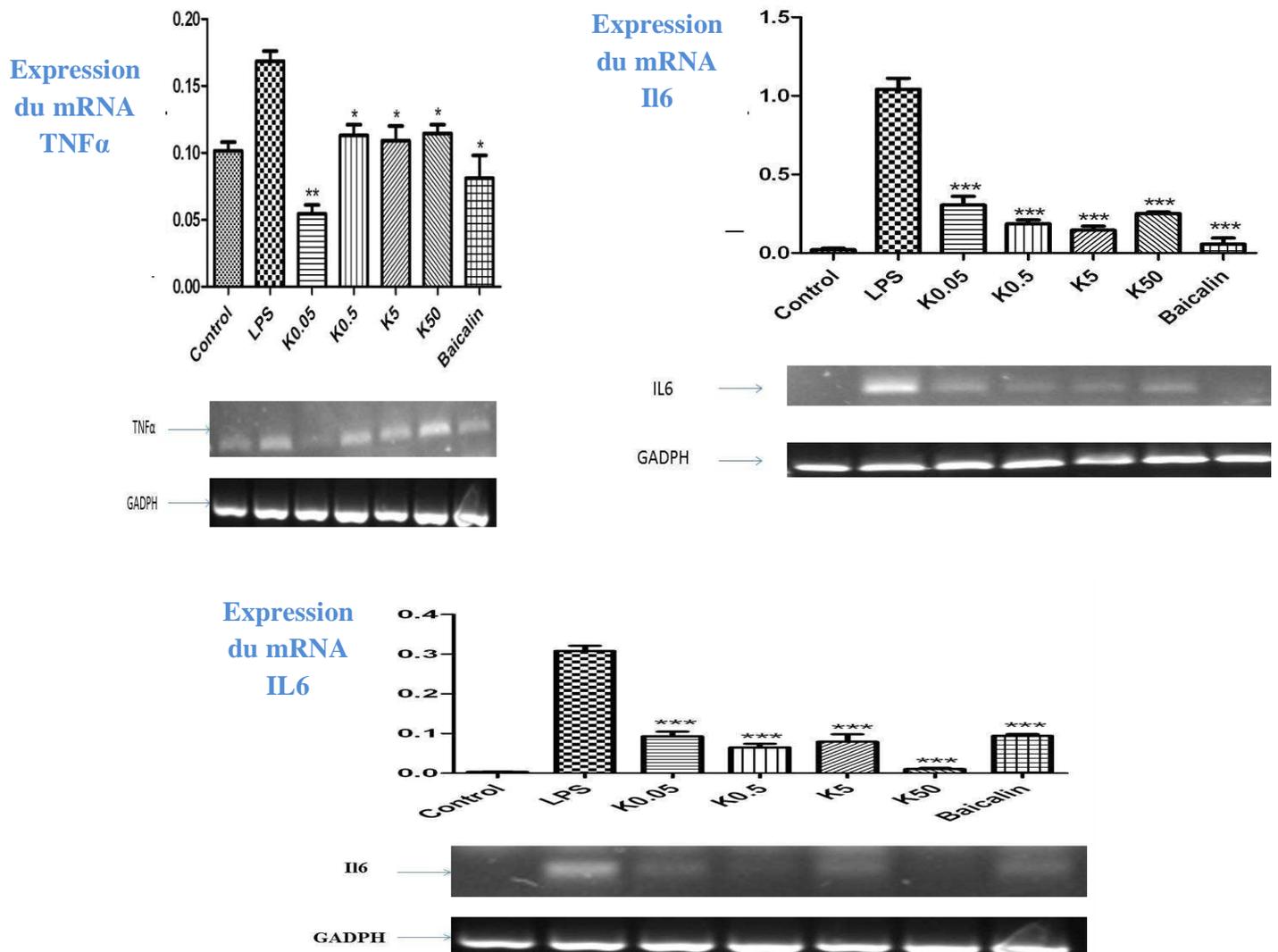


Figure 40. Effet de la fraction 25 de *K. grandifoliola* sur l'expression des mRNA du TNF α et de l'IL6 dans les microglies. Les cellules N9 ont été prétraitées avec différentes concentrations de KGF25, avec ou sans LPS pour une période de stimulation de 24h. Les RNAs totaux des cellules ont été isolés, et les niveaux de mRNA du TNF α et de l'IL6 ont été mesurés par RT-PCR. L'expression de la β -actin a été utilisée comme contrôle interne. **P<0.05, ***P<0.01, et ****P<0.001 en comparaison au groupe traité par les LPS.

III-3.4 Effet des fractions et sous fraction 70/KF25 sur l'activité de la p38 MAPK Kinase et du JNK3

III-3.4.1 Effet de la sous fraction 70 et KF25 sur l'activité de la p38 MAPK Kinase

La sous fraction KSF70 a présenté un effet inhibiteur modéré sur l'enzyme dans la gamme de concentrations testées (0.1 to 100 µg/ml). Cependant, une inhibition significative a été obtenue avec la baicaline.

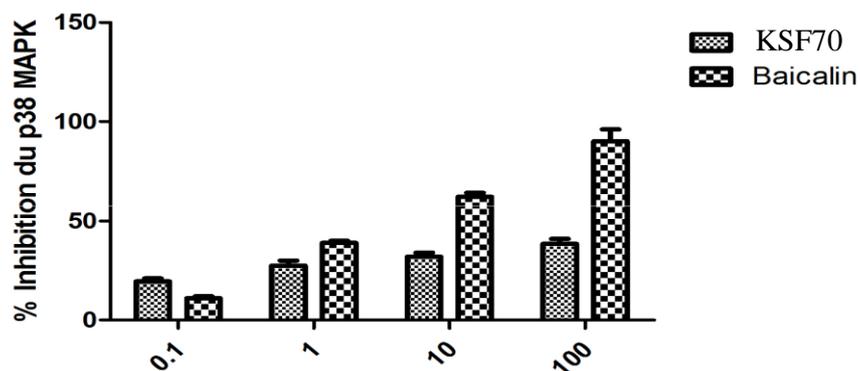


Figure 41. Effet de la sous fraction 70 de *K. grandifoliola* et de la baicaline sur l'inhibition de l'activité de la p38 MAPK Kinase. Le potentiel inhibiteur de la fraction et de la Baicaline a été évalué en utilisant un test ELISA contenant du BSA (0.01%) dans le tampon kinase. La SB203580 a été utilisée comme composé de référence.

Tableau 19: Valeurs des IC₅₀ de la fraction 25 de *K. grandifoliola* et des sous fractions issues de cette fraction, pour l'inhibition de l'activité de la p38 MAPKinase

Composés	Valeurs des IC ₅₀
Kg 25%	2,71 µg/ml
Baicaline	3,43 µg/ml
SF 103 /111	11,35 µg/ml
SF 112 / 120	51,58 µg/ml
SF 90 / 102	14,17µg/ml
SB 203580	0.035 µM

III-3.5 Effets de la fraction 25 sur le JNK3

L'effet de la fraction KGF25 a également été étudié sur l'inhibition du p38α et du JNK3. Les résultats sont consignés dans la figure 42 ci-dessous.

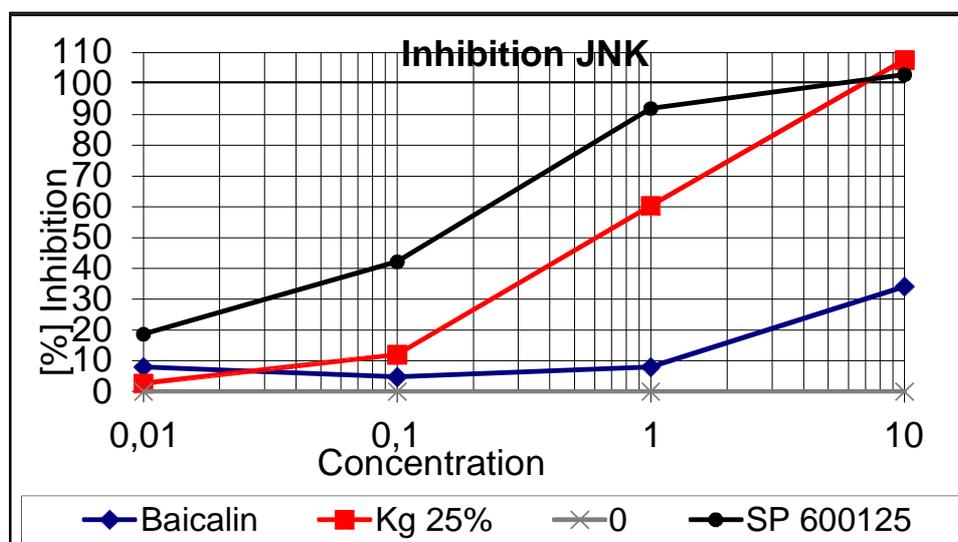


Figure 42: Inhibition de l'activité du JNK3 par la fraction KGF25. Les inhibiteurs compétissent avec l'ATP pour la fixation dans la même poche au site actif du JNK.

Les potentiels inhibiteurs de la fraction KGF25 et de la baicaline ont été évalués en utilisant un test ELISA contenant du BSA (0.01%) dans le tampon kinase. La SP 600125 a été utilisée comme composé de référence.

III.3.6 Discussion partielle

Les macrophages et les microglies jouent un rôle important dans la défense immunitaire. Dans les macrophages Raw 264.7 et les microglies N9, la stimulation par les LPS a été révélée comme induisant la transcription de l'iNOS et la synthèse de sa protéine, avec un accroissement de la production d'oxyde nitrique. De plus, la stimulation des cellules immunitaires et neuronales par les LPS a aussi été révélée comme induisant les mécanismes de signaux cellulaires NF κ B et MAPK (Jayakumar *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). Ainsi, ces systèmes cellulaires sont un excellent modèle pour la recherche des médicaments et une évaluation subséquente des potentiels inhibiteurs contre l'hyper activation de l'iNOS et la production d'oxyde nitrique. Dans notre démarche de recherche de nouveaux composés issus de produits naturels avec des activités anti-inflammatoires, nous avons préparé l'extrait au chlorure de méthylène /méthanol 1/1 v/v à partir de l'extrait brut de *K. grandifoliola*, un arbre utilisé en Afrique de l'Ouest et du Centre pour le traitement de nombreuses maladies. La réaction de Griess, une méthode spectrophotométrique de détermination de la production de nitrite, a été utilisée pour quantifier les niveaux de nitrite dans les milieux de culture cellulaire contenant les cellules Raw 264.7 et N9 traitées avec le LPS. La concentration finale de DMSO dans le milieu de culture a été de 0.1% et cette concentration de DMSO n'a pas affecté la viabilité des cellules. Le nombre de macrophages et de microglies actives n'a pas été significativement altéré par les concentrations d'extrait de plante utilisées comme indiqué par le test au MTT. Par conséquent, l'inhibition de la synthèse de NO par les extraits de plante n'est pas due à une simple cytotoxicité. Puisque l'extrait brut de *K. grandifoliola* a présenté un effet inhibiteur prometteur sur la production de NO par ces deux lignées cellulaires, cet extrait brut a par la suite été fractionné en 5 extraits différents. Une inhibition importante du NO a été obtenue avec les fractions 3, 4 et 5 sur les macrophages avec *K. grandifoliola*, et avec toutes les fractions testées sur les microglies à la concentration de 50 μ g/ml (plus de 50% d'inhibition). Ces résultats nous ont emmené à poursuivre un autre fractionnement en utilisant une chromatographie de colonne sur gel de silice. A l'issue de ce fractionnement, nous avons obtenu 24 sous-fractions à partir des 5 fractions de *K. grandifoliola*. Les sous fractions obtenues ont été utilisées pour le test d'inhibition du NO. Pour ce qui est des cellules Raw, les sous fractions 64-67, 78 et 70 ont montré le potentiel inhibiteur le plus intéressant (plus de 80% d'inhibition). Sur les cellules N9, la fraction 25 et les sous-fractions 90-102 et 70 ont présenté les activités les plus prometteuses (plus de 80% d'inhibition). Les valeurs des IC₅₀ des sous fractions et fractions les plus intéressantes sont

indiquées dans les tableaux 18 et 19, respectivement pour les macrophages et les microglies. Il ressort de ces résultats qu'une investigation approfondie des fractions et sous fractions étudiées pourrait aboutir à l'obtention de nouveaux composés anti-inflammatoires. Plusieurs composés issus de plantes médicinales ont montré des effets inhibiteurs de l'expression de l'iNOS induite par les LPS chez les macrophages et les microglies. La plupart d'entre eux sont révélés comme étant des flavonoïdes (Gong *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2013). Ainsi, les composés présentant un effet inhibiteur contre la production du NO pourraient être des composés prometteurs pour un isolement bioguidé des composés actifs présentant un effet inhibiteur sur l'iNOS.

La sous fraction 70 de *K. grandifoliola* et la fraction 25 de la même plante ont par la suite été étudiés pour leurs effets sur l'expression des mRNA des cytokines proinflammatoires, de l'iNOS, ainsi que pour l'inhibition de la p38 MAPKinase avec les macrophages et les microglies. La sous fraction 70 a présenté un effet inhibiteur sur l'expression des mRNA du TNF α et de l'IL-1 β . De même, cette fraction a présenté un effet inhibiteur sur l'expression de l'iNOS et ainsi que sur la production du NO par les cellules N9. Avec le test d'inhibition de la p38MAPK, une inhibition de 30% a été obtenue suite au test ELISA. Parallèlement, une inhibition de l'activation du JNK3 a été obtenue avec KGF25, contrairement à la baicaline. La fraction 25 a également présenté un effet inhibiteur sur l'expression des mRNA des cytokines l'IL6, le TNF α et l'IL-1 β aussi bien sur les cellules N9 que sur les cellules Raw 264.7. Les sous fractions 103/111, 112/120 et 90/102 ont présenté un effet inhibiteur intéressant sur l'inhibition de la production de NO. De ce fait, ces différentes sous fractions ont été étudiées pour leur capacité à inhiber l'activité de la p38MAPKinase. D'après les résultats obtenus, la fraction 25 entraîne une inhibition plus importante (Tableau 19) de l'activité des constituants du MAPK (p38 α et JNK3) par comparaison avec ses sous fractions et avec la baicaline. Ceci suggère que la fraction 25 contiendrait des composés capables d'inhiber cette voie de signalisation cellulaire.

III.3.7 Conclusion partielle

En conclusion, les données obtenues lors de cette étude suggèrent que les fractions et sous fractions de *K. grandifoliola* examinées dans cette étude présentent pour la plus-part un effet inhibiteur prometteur sur la production importante de NO par les cellules immunitaires. Une analyse de l'expression des cytokines proinflammatoires et de l'iNOS a montré que les composés issus des fractions et sous fractions de cette plante inhibent de manière significative l'expression des mRNAs de ces médiateurs de l'inflammation. En effet, la fraction 25 de cette plante apparaît plus intéressante non seulement à cause de sa capacité à inhiber les mRNAs des cytokines proinflammatoires et de l'iNOS, mais aussi du fait de l'inhibition de l'activité de la p38 MAPKinase et du JNK3 (de l'ordre de près de 90% et 60% respectivement), comparé à celle obtenue avec la baicaline. La détermination de la composition de cette fraction serait d'un apport important pour le développement de nouveaux principes thérapeutiques pour plusieurs maladies liées à l'inflammation.

III-4 Effet de la Baicaline sur les paramètres neuropathologiques et les déficits comportementaux dans un modèle de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la maladie neurodégénérative la plus commune et la cause majeure de démence. Ce désordre multifonctionnel est cliniquement défini par un déficit de mémoire progressif et est neuropathologiquement caractérisé par une agrégation de β -amyloïde et une hyperphosphorylation de la protéine tau. Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle de souris transgénique APP/PS1 pour mimer la maladie d'Alzheimer.

Plusieurs travaux ont été réalisés pour démontrer les propriétés de la baicaline. Des expériences *in vitro* ont montré que la baicaline supprime la production excessive d'oxyde nitrique (NO) et l'expression de l'inducible nitric oxide synthase (iNOS) induite par les LPS ou par l'interféron-gamma (IFN-gamma) chez les macrophages Raw 264.7 et les microglies. Ce composé pourrait être un bon candidat pour le traitement de l'inflammation dans le cerveau. Cette partie du travail évalue pour la première fois *in vivo*, l'effet de la baicaline dans un modèle expérimental de la maladie d'Alzheimer.

III-4-1 Test de construction des nids

Pour évaluer l'influence de l'administration de la baicaline sur le comportement de construction des nids, nous avons évalué la construction des nids avec les papiers filtres en utilisant un système de notation de 3 points (comme décrit dans la section Matériel et Méthodes) chez des souris naïves et des souris APP/PS1. Le regroupement des papiers dans les cages se présente comme indiqué dans la figure 43 ci-dessous.

A



Score 1 (groupe témoin)

B



Score 3 (groupe traité à la Baicalin)

(Owona, 2012)

Figure 43: Test de construction des nids

La figure ci-dessus montre la répartition des papiers filter dans les cages. A. Groupe témoin, les papiers sont dispersés dans la cage. B. Groupe traité à la baicaline, les papiers ont été découpés et rangés à un coin de la cage.

Avant le début du traitement, l'habileté à construire les nids a été comparée entre les souris APP/PS1 et les souris naïves, et une incapacité à construire les nids a été observée en ce qui concerne les souris APP/PS1 ($APP/PS1=1.5\pm 0.2$, $P<0.05$, $n=6$). Durant le traitement expérimental, aucune différence significative entre le groupe baicaline et les groupes témoins n'a pu être observée (groupe baicalin= 1.9 ± 0.2 , groupe témoin= 1.8 ± 0.2 , $p<0.05$, $n=6$) exactement au début du traitement, précisément au premier jour. Cependant, une différence significative entre la baicalin et le groupe témoin a été observée au 11^{ème} jour (groupe baicaline= 2.1 ± 0.1 , groupe témoin= 1.4 ± 0.2 , $P<0.05$, $n=6$). Après 10 jours de traitement avec la baicaline, des effets de déchirure des papiers filters ont été observés chez les souris, les papiers ont été découpés en pièces et groupés à un coin de la cage. Au contraire, les souris APP/PS1 provenant du groupe témoin n'ont pas découpé les papiers, juste de façon similaire qu'ils l'ont fait 10 jours auparavant, les

papiers filtres ont été dispersés dans toute la cage, et non groupés. Le traitement avec la baicaline a amélioré l'habileté à construire des nids de ces souris transgéniques.

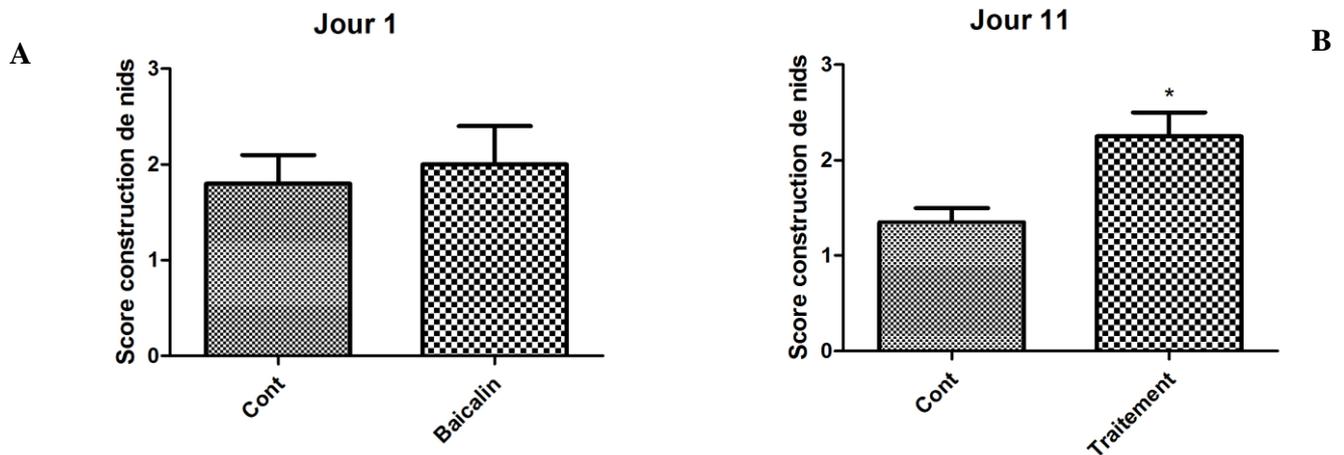


Figure 44: Test de construction des nids par les souris transgéniques traitées ou non à la baicaline. A. Le premier jour du traitement, B. 11^{ème} jour du traitement. *P<0.01 en comparaison au groupe témoin.

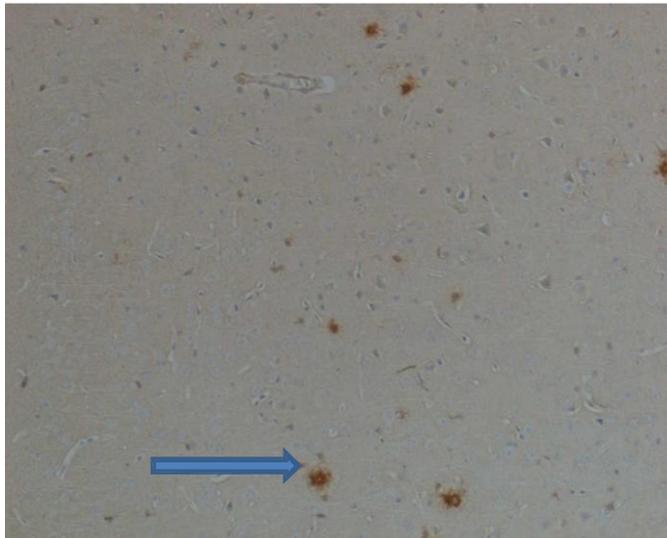
III-4-2 Effet du traitement à la Baicaline sur le dépôt des plaques d'amyloïde et l'activation des microglies

Les plaques de β -amyloïde sont entièrement distribuées dans le cortex des souris transgéniques APP/PS1 âgées de 5 mois, certaines parmi elles sont petites, denses, certaines sont de larges plaques. Dans l'hippocampe, un nombre relativement bas de plaques est observé.

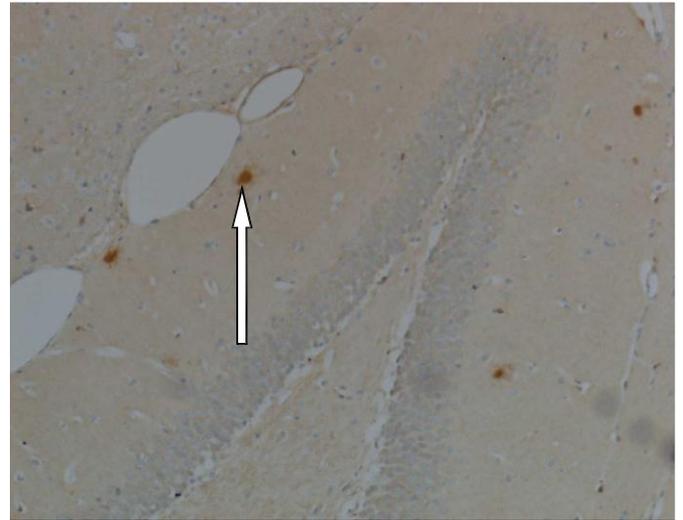
Les souris transgéniques ont premièrement été traitées par gavage avec une suspension de baicalin ou du véhicule pendant 10 jours. Aucune différence significative sur le dépôt d'amyloïde β ou de l'expression des cellules Iba+ n'a pu être observée entre les souris APP/PS1 et le groupe témoin (seulement traité avec le véhicule) aussi bien dans l'hippocampe que dans le cortex. Le nombre de plaques A β dans les cerveaux des souris APP/PS1 a été compté par 2 observateurs membres du groupe de recherche indépendants, qui n'étaient pas au courant des traitements effectués. Le traitement à la baicalin a réduit le nombre de plaques (témoin = 144.2 ± 12.4 , baicaline = 116.5 ± 9.0 , $p < 0.05$, $n = 6$). Dans le groupe traité à la baicaline, la plupart des plaques sont de petites tailles comparé au groupe témoin. La figure 45 ci-dessous montre des photographies des coupes

histologiques du foie, de l'hippocampe et du cortex des souris transgéniques traitées ou non par la baicaline.

Groupe témoin APP/PS1

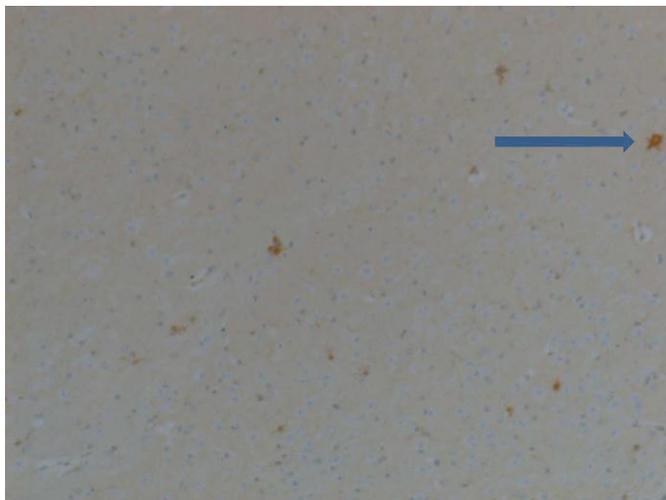


Cortex

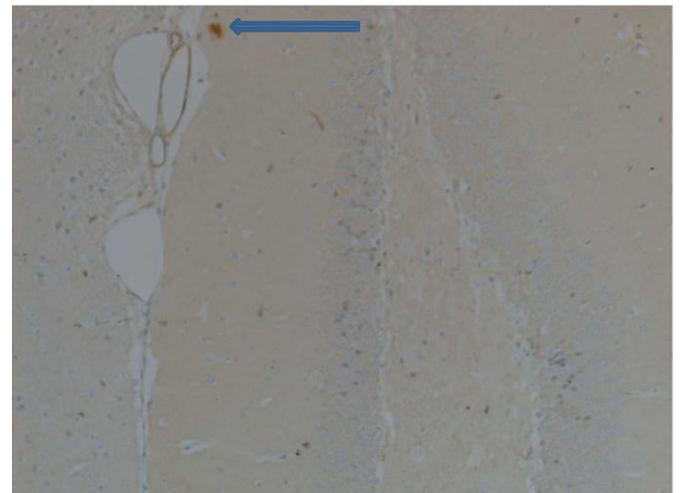


Hippocampe

Traitement Baicaline



Cortex



Hippocampe

Figure 45: Coupes histologiques montrant l'accumulation des plaques d'amyloïde β dans le Cortex et l'hippocampe des souris non traitées et traitées a la baicaline. Les flèches indiquent les dépôts de β -amyloïde dans les différents organes (Owona, 2012).

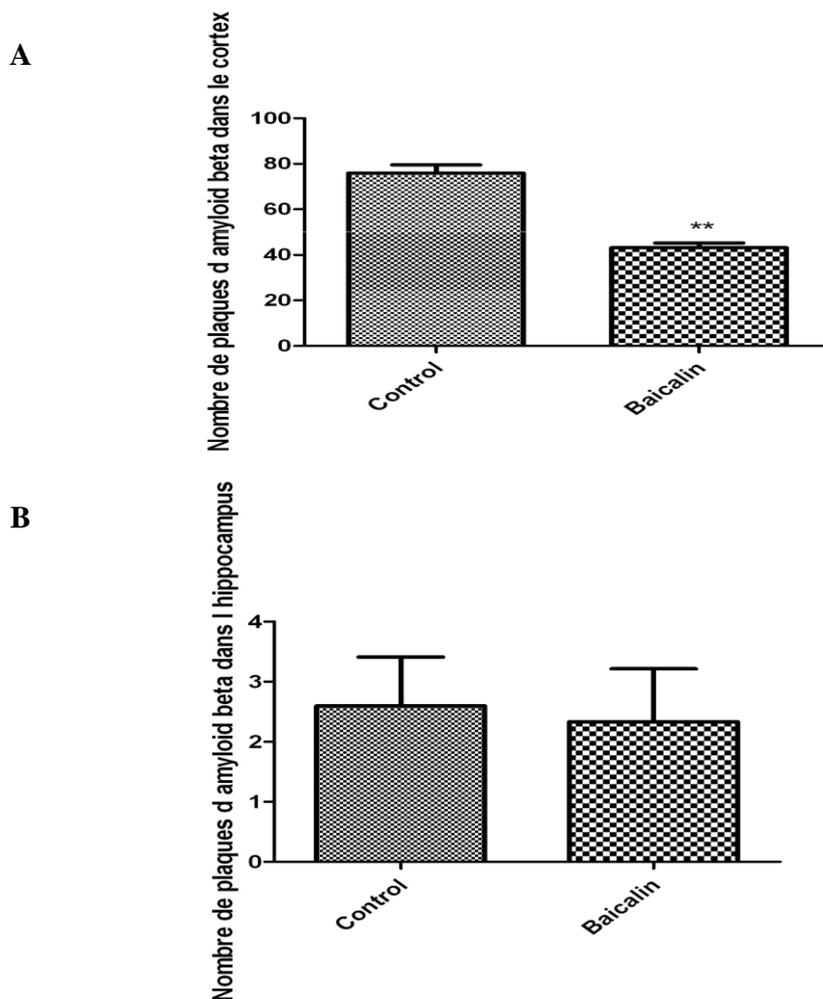
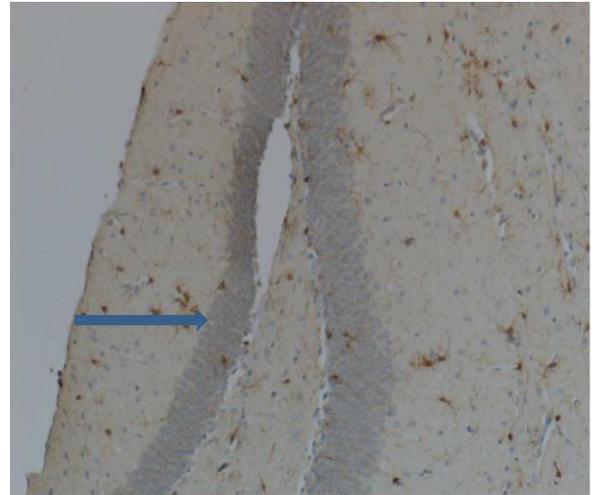
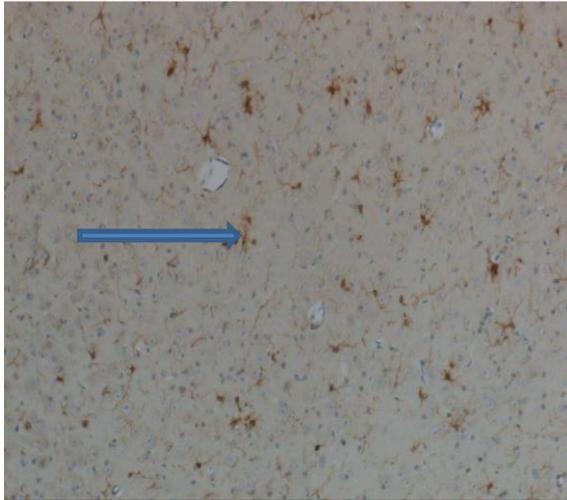


Figure 46: Nombre de plaques d'amyloïde β dans le cortex (A) et l'hippocampe (B). A. Nombre de plaques dans le cortex, B. Nombre de plaques dans l'hippocampe. ** $P < 0.01$ en comparaison au groupe témoin.

Dans le cortex comme dans l'hippocampe, les microglies Iba+ positives, caractérisées par de fines branches tortueuses, ont été observées formant des agrégats autour des dépôts d'amyloïdes ce qui indique une microgliose distincte. Le traitement avec la baicaline a significativement réduit le nombre de cellules Iba+ dans le cortex (baicaline = 111 ± 0.02 , témoin = 255 ± 0.5 ; $P < 0.05$; $n=6$). Les cellules Iba+ sont moins groupées entre elles et présentent une morphologie avec peu de

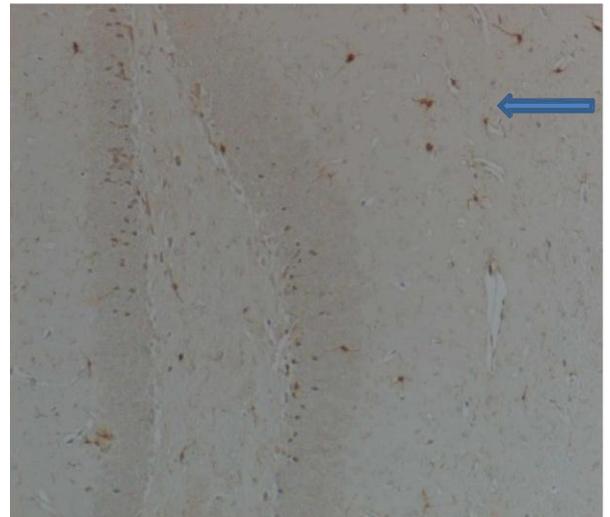
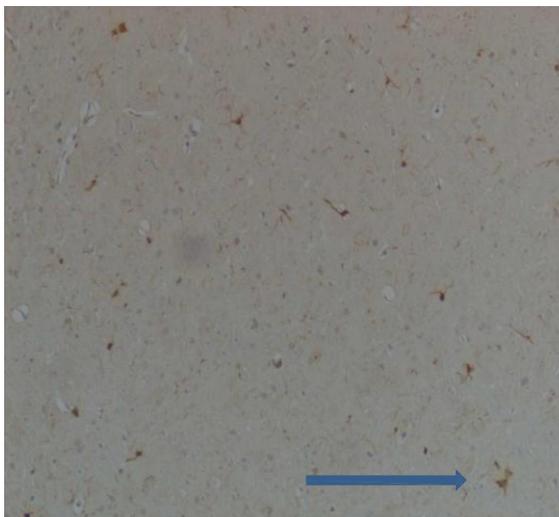
branches, indiquant une activation réduite des microglies suite au traitement par la baicaline. Les figures suivantes montrent les coupes des différents organes (hippocampe et cortex) et l'accumulation des cellules Iba+ (marqueurs des microglies).

Cellules Iba+
Temoin APP/PS1



Cortex
Traitement Baicaline

Hippocampe



Cortex

Hippocampe

Figure 47: Coupes histologiques montrant l'accumulation des plaques de cellules Iba+ dans le cortex, et l'hippocampe des souris traitées à la baicaline (Owona., 2012). Les flèches indiquent les dépôts de β -amyloïde dans les différents organes.

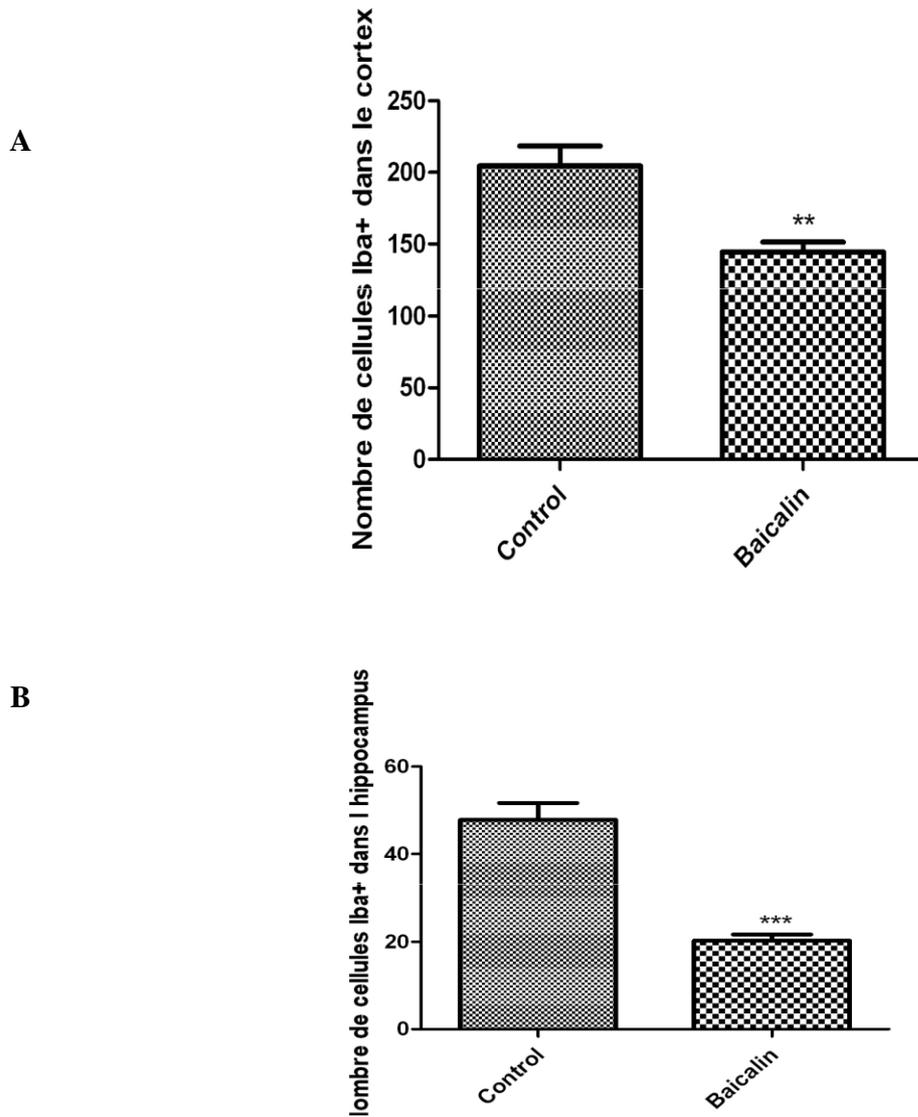


Figure 48: Nombre de cellules Iba+ dans le cortex et l'hippocampe.

A. Nombre de cellules Iba+ dans le cortex, B. Nombre de cellules Iba+ dans l'hippocampe.

P<0.01, et *P<0.001 en comparaison au groupe témoin.

III-4-4 Discussion partielle

Dans ce travail nous décrivons les effets thérapeutiques et bénéfiques de la baicaline, un flavonoïde isolé de la plante médicinale Chinoise *Scuterialia Baicalensis*, dans un modèle d'amyloïdose cérébrale APP/PS1 pour la maladie d'Alzheimer. Un traitement oral avec la baicaline atténue significativement le dépôt des plaques d'amyloïde β et l'activation des microglies dans le cortex et dans l'hippocampe des souris APP/PS1 âgées de 5 mois. La baicaline a présenté plusieurs effets bénéfiques sur l'inhibition de la production du NO par les cellules microgliales, et inhibe également plusieurs mécanismes d'activation des signaux cellulaires comme le TLR 4 et le NF κ B (Yuan *et al.*, 2012), (Wang *et al.*, 2012), (Jingcheng *et al.*, 2010), contribuant à l'atténuation de l'inflammation. Il a été reporté que les stratégies thérapeutiques contrôlant l'activation des microglies et la forte production des facteurs pro-inflammatoires et pro-oxydants pourraient être bénéfique pour contrôler la neurodégénération et la démence (Agostinho *et al.*, 2010). Le rôle majeur de la neuroinflammation a été reporté dans des modèles de lapin et humains (Martin-Moreno *et al.*, 2012), et l'atténuation des facteurs liés à l'inflammation est connue comme contribuant à l'amélioration de la maladie d'Alzheimer, parmi lesquels la phosphorylation de la protéine tau et l'accumulation des plaques d'amyloïde β (Tweedie *et al.*, 2012). En rapport avec les données obtenues antérieurement et confirmées dans nos études dans ce document, la baicaline atténue effectivement la réaction inflammatoire et réduit la production des cytokines/molécules pro-inflammatoires dans les macrophages et les microglies en culture. Dans notre présente étude *in vivo*, la Baicalin a significativement atténué l'activation des microglies dans le cortex des souris APP/PS1, suggérant un effet inhibiteur sur la neuroinflammation dans ce modèle animal, qui contribuerait à l'amélioration de la pathologie et des troubles comportementaux.

Les déficits de mémoire et comportementaux sont des caractéristiques de la plupart des maladies neurodégénératives du système nerveux central parmi lesquelles la maladie d'Alzheimer. En plus des effets toxiques liés aux peptides A β , la réaction inflammatoire et les marqueurs/molécules de l'inflammation sont rapportés comme étant directement associés aux déficits de mémoire et comportementaux (Ownby, 2010). Plusieurs modèles de souris de la maladie d'Alzheimer sont utilisés pour évaluer le potentiel thérapeutique et un meilleur contrôle de cette maladie.

La capacité à construire des nids est un comportement social et un facteur très important pour la survie des animaux. Une incapacité à construire des nids a été observée dans un modèle similaire de lapins Tg 2576, exprimant l'APP. Le dépôt d'A β et les facteurs toxiques liés à l'APP sont

reconnus comme entraînant une incapacité à construire les nids chez ces animaux (Wesson et Wilson, 2011). Avec notre modèle APP/PS1, nous avons observé une incapacité similaire à construire des nids en comparaison avec le groupe témoin naïf. Après 10 jours de traitement avec la baicaline, la capacité à construire des nids préalablement affectée a été restaurée (Fig.44).

IV-5 Conclusion partielle

Pris ensemble, le traitement oral avec la baicaline améliore effectivement la réaction neuroinflammatoire et l'amyloïdose cérébrale dans notre modèle animal de la maladie d'Alzheimer, tout ceci suggérant que la baicaline pourrait être une option thérapeutique prometteuse pour le traitement de la maladie d'Alzheimer chez les humains et d'autres maladies neurodégénératives.

CHAPITRE 4: DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES

IV-1 DISCUSSION GENERALE

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par une inflammation accrue au niveau du cerveau. Parmi les composés utilisés *in vitro* pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, la baicaline a présenté des effets prometteurs. Les plantes de notre pharmacopée locale qui sont *Khaya grandifoliola* et *E. africana* contiennent des polyphénols qui sont des composés efficaces dans le traitement de l'inflammation. En plus, dans nos études précédentes, ces plantes ont montré des activités immunomodulatrices sur les macrophages de rats. Dans la continuité de ces études, nous avons dans ce travail recherché des composés potentiellement efficaces dans le traitement de l'inflammation et des maladies liées à elle comme la maladie d'Alzheimer.

L'inflammation est un mécanisme naturel de l'organisme face aux attaques extérieures. Au cours de l'inflammation, les cellules immunitaires produisent des molécules et activent des enzymes et signaux moléculaires qui, lorsqu'ils sont produits de façon exagérée sont à l'origine de nombreuses maladies chez les humains. Parmi les molécules produites lors de l'inflammation, l'Oxyde nitrique est reconnu comme étant un important médiateur pour la communication cellulaire dans plusieurs systèmes (en plus des cellules endothéliales) tels que les macrophages, les neutrophiles, le muscle lisse et le système nerveux central (Egashira *et al.*, 2000). Plusieurs études ont démontré que l'induction de l'iNOS produit de larges quantités de NO sous des conditions inflammatoires. Ainsi, les médicaments/composés qui inhibent l'expression de l'iNOS et/ou l'activité de cette enzyme résultant en une diminution de la production de NO pourraient avoir des effets thérapeutiques bénéfiques dans le traitement des maladies causées par une hyperproduction de NO (Boomsma *et al.*, 1999; Horstman *et al.*, 1999).

Dans cette étude, l'exposition des macrophages Raw 264.7 aux LPS pendant plusieurs heures a été associée à une accumulation de nitrite dans le milieu de culture, suggérant une activation de la production de NO. Cette hyperproduction de NO induite par les LPS a été inhibée par les fractions de *E. africana*, *Khaya grandifoliola* et la baicaline, qui ont été co-incubés avec les LPS (1 µg/ml) en fonction du temps (pendant 24 h), sans qu'il n'y ait une cytotoxicité notable. La présente étude a démontré que l'effet inhibiteur de ces composés sur la production de NO induite par les LPS est lié à une inhibition du mRNA de ces cellules. Ce qui suggère que l'inhibition de la production de NO induite par les LPS dans les macrophages et les microglies a lieu à travers une inhibition de l'iNOS, l'enzyme responsable de la production de NO. La réponse inflammatoire dans le système nerveux central est médiée par les microglies activées qui jouent un rôle important dans la défense

de l'hôte mais qui sont aussi impliquées dans le développement des maladies neurodégénératives. La présente étude a confirmé que les microglies murins produisent du NO et activent des cytokines proinflammatoires en réponse à l'activation par les LPS avec implication de plusieurs autres signaux moléculaires.

Les microglies sont les principales cellules immunocompétentes et phagocytaires du système nerveux central. Notre étude confirme que le LPS induit significativement l'expression des cytokines proinflammatoires (TNF α , IL6 et IL1 β), et induit l'expression de l'iNOS et la production de NO par les microglies. En se fixant à des récepteurs cellulaires tels que le TLR4, le LPS active le NF κ B à travers le TAK1, et active également l'AP-1 à travers la voie TAK1-MAP kinase (ERK1/2, p38, JNK) (Aderem et Ulevitch, 2000; Kawai et Akira, 2007). Il a été reporté que, dans les microglies, les LPS stimulent l'expression du TNF α à travers une activation de l'ERK1/2, du p38, du JNK/AP-1 et du NF κ B (Czeloth *et al.*, 2005) et stimulent l'expression de l'iNOS à travers le p38 et le NF κ B (Zhang *et al.*, 1998).

L'effet biologique des flavonoïdes est lié à leur habileté à influencer les voies de signalisation cellulaire et à moduler l'expression des gènes proinflammatoires qui affectent les fonctions de plusieurs systèmes enzymatiques (ex. la tyrosine et les protéines sérine thréonine kinases) dans le développement de la réponse inflammatoire. En plus, d'autres effets indépendants de ces composés pourraient être liés à leurs propriétés antioxydantes. Les MAPK (Mitogen-activated protein kinases) constituent une famille spécifique de kinases sérine/thréonine et agissent en phosphorylant les substrats cibles, par ce fait contrôlent les fonctions cellulaires importantes telles que l'expression des gènes et l'apoptose (Shen *et al.*, 2007). Le MAPK est une cascade constituée de 3 kinases. La JNK et la p38 sont parfois appelés « stress activated protein kinases » puisqu'elles sont fréquemment activées durant l'inflammation. Le MAPK p38 α joue un rôle crucial dans la transduction du signal et est impliqué dans la biosynthèse et la libération des cytokines proinflammatoires telles que l'IL1 et le TNF α . L'inhibition de cette kinase peut être un moyen efficace de traiter les maladies inflammatoires. Plusieurs inhibiteurs avec différents modes d'interaction avec des protéines et différentes structures chimiques ont été développés pour des applications pharmaceutiques sur la base de leur habileté à compétir avec l'ATP au site catalytique de l'enzyme (Shen *et al.*, 2007). Ainsi, à travers l'inhibition des enzymes du système MAPK, les polyphénols pourraient moduler l'expression de cytokines proinflammatoires telles que l'ATF-2 et le c-JUN et l'identification des composés pouvant interférer de manière sélective avec

l'inhibition du MAPK pourrait offrir une stratégie alternative pour le développement d'une nouvelle classe d'agents anti-inflammatoires.

En premier, nous avons investigué l'effet de la fraction Ea5 sur l'expression des mRNAs des cytokines pro et anti-inflammatoires que sont l'IL1 β , TNF α , IL6, IL13 et IL10. Il ressort des figures 19 et 20 que, Ea5, et la baicaline suppriment significativement l'expression des mRNA des cytokines induite par les LPS (1 μ g/ml) dans les macrophages Raw 264.7 et stimule l'expression des mRNAs de l'IL13 et de IL10 (cytokines anti-inflammatoires). Cette observation confirme ainsi les effets anti-inflammatoires et immunomodulateurs d'Ea5. Il a été démontré que les ROS sont des molécules importantes produites par les cellules immunitaires lors de l'inflammation. Ces molécules contribuent à l'élimination des agents pathogènes au cours de la phagocytose ([Whitaker-Menezes et al., 2012](#)). Cependant, une production excessive de ROS pourrait amplifier l'inflammation ([Dumont et Beal, 2011](#)). Nous avons ainsi examiné la capacité de la fraction Ea5 à diminuer la production des ROS (Fig.17) aux concentrations testées.

Nous avons également exploré l'expression des cytokines proinflammatoires et du mRNA de l'iNOS dans les microglies *in vitro*. Les résultats obtenus ont été comparés une fois de plus à ceux obtenus avec la baicaline. En plus, nous avons étudié la capacité d'*E. africana* et de la baicaline à inhiber l'activité de l'enzyme p38 MAPK Kinase. Nous avons constaté que l'incubation des cellules N9 avec les LPS (1 μ g/ml) entraîne une augmentation du NO dans le milieu de culture cellulaire accompagné d'une induction de l'expression du mRNA de l'iNOS (Fig.29). D'après nos résultats, nous pouvons penser que l'extrait brut et les fractions d'*E. africana* suppriment fortement la production de NO dans des microglies stimulées par les LPS. Cette fraction supprime également l'expression du mRNA des cytokines proinflammatoires des cytokines les plus importantes telles l'IL6, IL-1 β et le TNF α (Fig.28).

L'extrait brut de *K. grandifoliola* a présenté un effet inhibiteur prometteur sur la production de NO par les macrophages et les microglies, il a par la suite été fractionné en 5 extraits différents. Une inhibition importante du NO a été obtenue avec les fractions 3, 4 et 5 sur les macrophages avec *K. grandifoliola*, et avec toutes les fractions testées sur les microglies à la concentration de 50 μ g/ml (plus de 50% d'inhibition).

Ces résultats nous ont emmené à poursuivre le fractionnement des fractions en utilisant une chromatographie de colonne sur gel silice. La fraction 25 de *K. grandifoliola* a par la suite été

étudiée pour ses effets sur l'expression des mRNA des cytokines proinflammatoires, de l'iNOS, ainsi que pour l'inhibition de la p38 MAPKinase. Une inhibition de l'activation du JNK3 a été obtenue avec KGF25, contrairement à la baicaline. Cette fraction a également présenté un effet inhibiteur sur l'expression des mRNA des cytokines l'IL6, le TNF α et l'IL-1 β aussi bien sur les cellules N9 que sur les cellules Raw 264.7. D'après les résultats obtenus, la fraction 25 entraîne une inhibition plus importante (Tableau 19) de l'activité des constituants du MAPK (p38 α et JNK3) par comparaison avec ses sous fractions et avec la Baicaline.

Le dépôt d'A β et les facteurs toxiques liés à l'APP sont reconnus comme entraînant une incapacité à construire les nids chez ces animaux (Wesson et Wilson, 2011). Avec notre modèle APP/PS1, nous avons observé une incapacité similaire à construire des nids en comparaison avec le groupe témoin naïf. Après 10 jours de traitement avec la baicaline, la capacité à construire des nids préalablement affectée a été restaurée (Fig.44).

Les polyphénols sont des composés généralement retrouvés dans les plantes naturelles. Plusieurs études ont démontré que les composés phénoliques dérivés de plantes médicinales possèdent plusieurs activités biologiques parmi lesquelles l'élimination des radicaux libres (Schulman *et al.*, 1999), les activités anti-inflammatoires (De Villiers *et al.*, 1998) et anticancéreuses. L'étude phytochimique des fractions *Khaya grandifoliola* KGF25 (38.40 ± 0.03 EAC) et *Entada africana* Ea5 (27.43 ± 0.57 EAC) a montré que ces fractions sont riches en polyphénols, ce qui pourrait expliquer leur potentiel anti-inflammatoire et immunomodulateur; les fractions KF25 et Ea5 ayant présenté des activités meilleures que celles de la baicaline, un composé pur isolé de *Scuterialia Baicalensis*. Des tests *in vivo* sur des modèles de la maladie d'Alzheimer pourraient ainsi être concluants en ce qui concerne le traitement de cette maladie.

IV-2 Conclusion générale

Khaya grandifoliola (Méliaceae) et *Entada africana* (Fabaceae) sont deux plantes utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement de plusieurs maladies telles que les maladies du foie, la fièvre et la dysenterie. La Baicaline est un flavonoïde isolé de *Scutereia baicalensis* qui est utilisé dans le cas de traitement de maladies liées à l'inflammation. Dans l'hypothèse de travail, nous avons estimé que malgré le fait que *Khaya grandifoliola* et *Entada africana* modulent les fonctions phagocytaires et chimiotactiques des macrophages péritonéaux de rats stimulés, ces plantes pourraient ne pas posséder des propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatoires sur les cellules Raw 264.7 et N9.

Dans notre recherche de composés ayant des propriétés anti-inflammatoires, immunomodulatrices et prometteurs dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, nous avons au cours de ce travail pu rejeter cette hypothèse en montrant que:

Ea5 inhibe significativement la production de NO par les macrophages et les microglies intoxiqués par les LPS. Cette fraction inhibe l'expression des mRNAs des cytokines proinflammatoires telles que l'IL6, le TNF et l'IL1 β par les macrophages et les microglies, stimule l'expression des mRNA des cytokines anti-inflammatoires IL10 et IL13.

KG70 inhibe la production de NO, des mRNAs de l'iNOS, IL6, TNF α et IL1 β et l'activité de la p38MAPKinase des microglies. KGF25 inhibe la production de NO, des mRNA de l'iNOS, IL6, TNF α et IL1 β et l'activité de la p38MAPKinase et du JNK3 des macrophages.

La baicaline améliore la capacité de formation des nids par les souris transgéniques APP/PS1. Elle réduit par ailleurs le nombre de plaques d'amyloïdes β formées dans le cortex et l'hippocampe chez ces souris et atténue l'inflammation dans le cortex et l'hippocampe des souris transgéniques en réduisant le nombre de microglies Iba+ dans ces organes.

IV-3 PERSPECTIVES

Dans l'optique de mieux cerner le mécanisme d'action des différentes fractions et sous fractions obtenues dans cette thèse, nous comptons dans un avenir proche :

Déterminer la composition des fractions et sous fractions (Ea5, KGF70 et KGF25) par HPLC et spectrophotométrie de masse, isoler et déterminer les structures des composés purs présents.

Evaluer les effets des substances actives *in vitro* sur l'expression des protéines NFκB dans les macrophages et les microglies.

Déterminer l'effet des composés isolés de ces fractions avec comme modèle la maladie d'Alzheimer.

Effectuer des tests de toxicité subaigue et chronique.

Faire une étude épidémiologique visant à déterminer la prévalence et l'incidence de la maladie d'Alzheimer au Cameroun.

,

BIBLIOGRAPHIE

- Aam, B. B. and F. Fonnum (2007). "ROS scavenging effects of organic extract of diesel exhaust particles on human neutrophil granulocytes and rat alveolar macrophages." Toxicology **230**(2-3): 207-218.
- Aam, B. B., O. Myhre, et al. (2003). "Transcellular signalling pathways and TNF-alpha release involved in formation of reactive oxygen species in rat alveolar macrophages exposed to tert-butylcyclohexane." Archives of Toxicology **77**(12): 678-684.
- Abad, M. J., P. Bermejo, et al. (2004). "Flavonoids and a sesquiterpene lactone from *Tanacetum microphyllum* inhibit anti-inflammatory mediators in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages." Planta Medica **70**(1): 34-38.
- Abbas, K., J. Breton, et al. (2011). "Nitric oxide activates an Nrf2/sulfiredoxin antioxidant pathway in macrophages." Free Radical Biology and Medicine **51**(1): 107-114.
- Abid, S., A. Khajuria, et al. (2012). "Immunomodulatory studies of a bioactive fraction from the fruit of *Prunus cerasus* in BALB/c mice." International Journal of Immunopharmacology **12**(4): 626-634.
- Abuarqoub, H., R. Foresti, et al. (2006). "Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory actions of 2'-hydroxychalcone in RAW 264.7 murine macrophages." American Journal of Physiology Cell Physiology **290**(4): C1092-1099.
- Adam, L., M. Bouvier, et al. (1999). "Nitric oxide modulates beta(2)-adrenergic receptor palmitoylation and signaling." Journal of Biological Chemistry **274**(37): 26337-26343.
- Aderem, A. and R. J. Ulevitch (2000). "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response." Nature **406**(6797): 782-787.
- Adler, H., E. Peterhans, et al. (1994). "Inducible L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in bovine bone marrow-derived macrophages." Biochemical and Biophysical Research Communications **198**(2): 510-515.
- Agouni, A., A. H. Lagrue-Lak-Hal, et al. (2009). "Red wine polyphenols prevent metabolic and cardiovascular alterations associated with obesity in Zucker fatty rats (Fa/Fa)." PLoS One **4**(5): e5557.
- Ahmad, N., L. C. Chen, et al. (2002). "Regulation of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in activated hepatic macrophages during acute endotoxemia." Journal Of Leukocyte Biology **71**(6): 1005-1011.
- Ahmad, S. T., W. Arjumand, et al. (2012). "Hesperidin alleviates acetaminophen induced toxicity in Wistar rats by abrogation of oxidative stress, apoptosis and inflammation." Toxicology Letters **208**(2): 149-161.

- Ajiboye, T. O., Y. O. Komolafe, et al. (2013). "Diethylnitrosamine-induced redox imbalance in rat microsomes: protective role of polyphenolic-rich extract from Sorghum bicolor grains." Journal of Basic Clinical Physiology and Pharmacology **24**(1): 41-49.
- Ajizian, S. J., B. K. English, et al. (1999). "Specific inhibitors of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon-gamma." Journal of Infectious Diseases **179**(4): 939-944.
- Akifusa, S., N. Kamio, et al. (2010). "Involvement of the JAK-STAT pathway and SOCS3 in the regulation of adiponectin-generated reactive oxygen species in murine macrophage RAW 264 cells." Journal of Cellular Biochemistry **111**(3): 597-606.
- Akunda, J. K., F. A. Ahrens, et al. (2001). "Evaluation of phagocytosis, bactericidal activity, and production of superoxide anion, nitric oxide, and tumor necrosis factor-alpha in Kupffer cells of neonatal pigs." American Journal of Veterinary Research **62**(7): 1040-1045.
- Albarracin, S. L., B. Stab, et al. (2012). "Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease." Nutritional Neuroscience **15**(1): 1-9.
- Albina, J. E., S. Cui, et al. (1993). "Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages." Journal of Immunology **150**(11): 5080-5085.
- Alcain, F. J. and J. M. Villalba (2009). "Sirtuin activators." Expert Opinion on Therapeutic Patents **19**(4): 403-414.
- Altavilla, D., F. Squadrito, et al. (2009). "Flavocoxid, a dual inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase, blunts pro-inflammatory phenotype activation in endotoxin-stimulated macrophages." British Journal of Pharmacology **157**(8): 1410-1418.
- Aquila, S., Z. Y. Weng, et al. (2009). "Inhibition of NF-kappaB activation and iNOS induction by ent-kaurane diterpenoids in LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophages." Journal of Natural Products **72**(7): 1269-1272.
- Arialdi M. Miniño, J.X., Kenneth D. Kochanek, 2010. Deaths: Preliminary Data for 2008. National Center for Health Statistics.
- Arjumand, W., A. Seth, et al. (2011). "Rutin attenuates cisplatin induced renal inflammation and apoptosis by reducing NFkappaB, TNF-alpha and caspase-3 expression in wistar rats." Food and Chemical Toxicology **49**(9): 2013-2021.
- Arko-Mensah, J., E. Julian, et al. (2007). "TLR2 but not TLR4 signalling is critically involved in the inhibition of IFN-gamma-induced killing of mycobacteria by murine macrophages." Scandinavian Journal of Immunology **65**(2): 148-157.

- Avontuur, J. A., F. Boomsma, et al. (1999). "Endothelin-1 and blood pressure after inhibition of nitric oxide synthesis in human septic shock." Circulation **99**(2): 271-275.
- Bae, Y., S. Lee, et al. (2011). "Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor-kappaB." Toxicology and Applied Pharmacology **254**(1): 56-64.
- Bas, E., M. C. Recio, et al. (2006). "Anti-inflammatory activity of 5-O-demethylnobiletin, a polymethoxyflavone isolated from *Sideritis tragoriganum*." Planta Medica **72**(2): 136-142.
- Beach, T.G., 2008. Physiologic origins of age-related beta-amyloid deposition. Neurodegenerative Diseases **5**, 143-145.
- Beckman, J. A., M. A. Creager, et al. (2002). "Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management." JAMA **287**(19): 2570-2581.
- Bernatova, I., O. Pechanova, et al. (2002). "Wine polyphenols improve cardiovascular remodeling and vascular function in NO-deficient hypertension." American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology **282**(3): H942-948.
- Bertram, L., Tanzi, R.E., 2008. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. Nature Reviews Neuroscience **9**, 768-778.
- Bertram, L., Tanzi, R.E., 2012. The genetics of Alzheimer's disease. Progress in Molecular Biology and Translational Science **107**, 79-100.
- Bhaskar, S., V. Shalini, et al. (2011). "Quercetin regulates oxidized LDL induced inflammatory changes in human PBMCs by modulating the TLR-NF-kappaB signaling pathway." Immunobiology **216**(3): 367-373.
- Bhat, K. H., A. Das, et al. (2013). "PPE2 protein of *Mycobacterium tuberculosis* may inhibit nitric oxide in activated macrophages." Annals of the New York Academy of Science **1283**: 97-101.
- Bhat, N. R., P. Zhang, et al. (1998). "Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures." Journal of Neuroscience **18**(5): 1633-1641.
- Bickii, J., N. Njifutie, et al. (2000). "In vitro antimalarial activity of limonoids from *Khaya grandifoliola* C.D.C. (Meliaceae)." Journal of Ethnopharmacology **69**(1): 27-33.
- Biesalski, H. K. (2007). "Polyphenols and inflammation: basic interactions." Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care **10**(6): 724-728.

- Bo, Y., L. P. Yuan, et al. (2012). "Total flavonoids of *Bidens bipinnata* L. a traditional Chinese medicine inhibits the production of inflammatory cytokines of vessel endothelial cells stimulated by sera from Henoch-Schonlein purpura patients." Journal of Pharmacy and Pharmacology **64**(6): 882-887.
- Boesch-Saadatmandi, C., A. E. Wagner, et al. (2012). "Effect of quercetin on inflammatory gene expression in mice liver in vivo - role of redox factor 1, miRNA-122 and miRNA-125b." Pharmacological Research **65**(5): 523-530.
- Boots, A. W., M. Drent, et al. (2011). "Quercetin reduces markers of oxidative stress and inflammation in sarcoidosis." Clinical Nutrition **30**(4): 506-512.
- Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C.B., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H.H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A.I., Gandy, S.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Price, D.L., Younkin, S.G., Sisodia, S.S., 1996. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. Neuron **17**, 1005-1013.
- Borra, M. T., B. C. Smith, et al. (2005). "Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol." Journal of Biological Chemistry **280**(17): 17187-17195.
- Botden, I. P., H. Oeseburg, et al. (2012). "Red wine extract protects against oxidative-stress-induced endothelial senescence." Clinical Science (Lond) **123**(8): 499-507.
- Boucher, J. L., J. Custot, et al. (1994). "N omega-hydroxyl-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase." Biochemical and Biophysical Research Communications **203**(3): 1614-1621.
- Branger, J., B. van den Blink, et al. (2002). "Anti-inflammatory effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor during human endotoxemia." Journal of Immunology **168**(8): 4070-4077.
- Brodsky, M., G. Halpert, et al. (2010). "The anti-inflammatory effects of the tellurium redox modulating compound, AS101, are associated with regulation of NFkappaB signaling pathway and nitric oxide induction in macrophages." Journal of Inflammation (Lond) **7**(1): 3.
- Bromberg, Y. and E. Pick (1980). "Cyclic GMP metabolism in macrophages. I. Regulation of cyclic GMP levels by calcium and stimulation of cyclic GMP synthesis by NO-generating agents." Cellular Immunology **52**(1): 73-83.
- Brunden, K.R., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.Y., 2009. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. Nature Reviews Drug Discovery **8**, 783-793.

- Bureau, G., F. Longpre, et al. (2008). "Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation." Journal of Neuroscience Research **86**(2): 403-410.
- Camouse, M. M., D. S. Domingo, et al. (2009). "Topical application of green and white tea extracts provides protection from solar-simulated ultraviolet light in human skin." Experimental Dermatology **18**(6): 522-526.
- Casas, C., Sergeant, N., et al. (2004). Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. The American Journal of Pathology **165**, 1289-1300.
- Cavet, M. E., K. L. Harrington, et al. (2011). "Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate in human corneal epithelial cells." Molecular Vision **17**: 533-542.
- Chakraborty, S., S. Stalin, et al. (2012). "The use of nano-quercetin to arrest mitochondrial damage and MMP-9 upregulation during prevention of gastric inflammation induced by ethanol in rat." Biomaterials **33**(10): 2991-3001.
- Chandler, D., A. Woldu, et al. (2010). "Effects of plant-derived polyphenols on TNF-alpha and nitric oxide production induced by advanced glycation endproducts." Molecular Nutrition and Food Research **54 Suppl 2**: S141-150.
- Chandrashekar, N., A. Selvamani, et al. (2012). "Baicalein inhibits pulmonary carcinogenesis-associated inflammation and interferes with COX-2, MMP-2 and MMP-9 expressions in vivo." Toxicology and Applied Pharmacology **261**(1): 10-21.
- Chang, C. P., Y. C. Su, et al. (2013). "Targeting NFKB by autophagy to polarize hepatoma-associated macrophage differentiation." Autophagy **9**(4): 619-621.
- Chen, H. Q., Z. Y. Jin, et al. (2008). "Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation." Neuroscience Letters **448**(2): 175-179.
- Chen, Y. C., S. C. Shen, et al. (2001). "Wogonin, baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide." Biochemical Pharmacology **61**(11): 1417-1427.
- Cheng, P. Y., Y. M. Lee, et al. (2007). "Protective effect of baicalein against endotoxic shock in rats in vivo and in vitro." Biochemical Pharmacology **73**(6): 793-804.
- Chew, L. J., A. Takanohashi, et al. (2006). "Microglia and inflammation: impact on developmental brain injuries." Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Review **12**(2): 105-112.

- Chi, Y. S., H. Lim, et al. (2003). "Effects of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: in vivo regulation of inflammation-associated gene expression." Biochemical Pharmacology **66**(7): 1271-1278.
- Chiang, S. S., L. T. Wang, et al. (2013). "Antibacterial and anti-inflammatory activities of mycelia of a medicinal mushroom from Taiwan, *Taiwanofungus salmoneus* (higher Basidiomycetes)." International Journal of Medical Mushrooms **15**(1): 39-47.
- Chin, J., 2011. Selecting a mouse model of Alzheimer's disease. Methods in Molecular Biology **670**, 169-189.
- Chishti, M.A., Yang, D.S, et al (2001). Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. Journal of Biological Chemistry **276**, 21562-21570.
- Choi, K. C., M. G. Jung, et al. (2009). "Epigallocatechin-3-gallate, a histone acetyltransferase inhibitor, inhibits EBV-induced B lymphocyte transformation via suppression of RelA acetylation." Cancer Research **69**(2): 583-592.
- Cioffi, G., F. Dal Piaz, et al. (2006). "Antiproliferative triterpene saponins from *Entada africana*." Journal of Natural Products **69**(9): 1323-1329.
- Cirulis, J. T., J. A. Scott, et al. (2013). "Management of oxidative stress by microalgae." Canadian Journal of Physiology and Pharmacology **91**(1): 15-21.
- Citron, M., Westaway, D, et al. (1997a). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. Nature Medicine **3**, 67-72.
- Ciz, M., P. Denev, et al. (2012). "Flavonoids inhibit the respiratory burst of neutrophils in mammals." Oxidative Medicine and Cellular Longevity **2012**: 181295.
- Cole, G. M., G. P. Lim, et al. (2005). "Prevention of Alzheimer's disease: Omega-3 fatty acid and phenolic anti-oxidant interventions." Neurobiology Aging **26 Suppl 1**: 133-136.
- Cole, S.L., Vassar, R., 2007. The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. Molecular Neurodegeneration **2**, 22.
- Collett, G. P. and F. C. Campbell (2004). "Curcumin induces c-jun N-terminal kinase-dependent apoptosis in HCT116 human colon cancer cells." Carcinogenesis **25**(11): 2183-2189.
- DeLaGarza, V.W., 2003. Pharmacologic treatment of Alzheimer's disease: an update. American Family Physician **68**, 1365-1372.

- Delgado, M. and D. Ganea (2001). "Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by VIP and PACAP in vitro and in vivo." Archives of Physiology and Biochemistry **109**(4): 377-382.
- Deshpande, R., H. Khalili, et al. (1997). "Estradiol down-regulates LPS-induced cytokine production and NFkB activation in murine macrophages." American Journal of Reproductive Immunology **38**(1): 46-54.
- Diallo, D., B. S. Paulsen, et al. (2001). "Polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity." Journal of Ethnopharmacology **74**(2): 159-171.
- Ding, B. J., W. W. Ma, et al. (2011). "Soybean isoflavone alleviates beta-amyloid 1-42 induced inflammatory response to improve learning and memory ability by down regulation of Toll-like receptor 4 expression and nuclear factor-kappaB activity in rats." International Journal of Developmental Neuroscience **29**(5): 537-542.
- Dolan, P.J., Johnson, G.V.W., 2010. The role of tau kinases in Alzheimer's disease. Current Opinion in Drug Discovery **13**, 595-603.
- Du, Q., X. Gu, et al. (2012). "Chrysin attenuates allergic airway inflammation by modulating the transcription factors T-bet and GATA-3 in mice." Molecular Medicine Report **6**(1): 100-104.
- Dumont, M. and M. F. Beal (2011). "Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease." Free Radical Biology and Medicine **51**(5): 1014-1026.
- Elder, G.A., Gama Sosa, M.A., De Gasperi, R., Dickstein, D.L., Hof, P.R., 2010b. Presenilin transgenic mice as models of Alzheimer's disease. Brain Structure and Function **214**, 127-143.
- Ellis, L. Z., W. Liu, et al. (2011). "Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses melanoma growth by inhibiting inflammasome and IL-1beta secretion." Biochemical and Biophysical Research Communications **414**(3): 551-556.
- Ertekin-Taner, N., 2007. Genetics of Alzheimer's disease: a centennial review. Neurologics Clinics **25**, 611-667, v.
- Essafi-Benkhadir, K., A. Refai, et al. (2012). "Quince (*Cydonia oblonga* Miller) peel polyphenols modulate LPS-induced inflammation in human THP-1-derived macrophages through NF-kappaB, p38MAPK and Akt inhibition." Biochemical and Biophysical Research Communications **418**(1): 180-185.
- Ewald, J. A., T. M. Downs, et al. (2013). "Expression Microarray Meta-Analysis Identifies Genes Associated with Ras/MAPK and Related Pathways in Progression of Muscle-Invasive Bladder Transition Cell Carcinoma." PLoS One **8**(2): e55414.

- Fabry, W., P. Okemo, et al. (1996). "Fungistatic and fungicidal activity of east African medicinal plants." *Mycoses* **39**(1-2): 67-70.
- Fang, S. H., Y. C. Hou, et al. (2003). "Morin sulfates/glucuronides exert anti-inflammatory activity on activated macrophages and decreased the incidence of septic shock." *Life Sciences* **74**(6): 743-756.
- Ferrario, A., M. Luna, et al. (2011). "Pro-apoptotic and anti-inflammatory properties of the green tea constituent epigallocatechin gallate increase photodynamic therapy responsiveness." *Lasers in Surgery and Medicine* **43**(7): 644-650.
- Figueirinha, A., M. T. Cruz, et al. (2010). "Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaf infusion in lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells: contribution of the polyphenols." *Journal of Medicinal Food* **13**(3): 681-690.
- Fischer, L. G., D. J. Horstman, et al. (1999). "Selective iNOS inhibition attenuates acetylcholine- and bradykinin-induced vasoconstriction in lipopolysaccharide-exposed rat lungs." *Anesthesiology* **91**(6): 1724-1732.
- Fortune, S. M., A. Solache, et al. (2004). "Mycobacterium tuberculosis inhibits macrophage responses to IFN-gamma through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms." *Journal of Immunology* **172**(10): 6272-6280.
- Fotio, A. L., M. L. Olleros, et al. (2010). "In vitro inhibition of lipopolysaccharide and mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin-induced inflammatory cytokines and in vivo protection from D-galactosamine/LPS -mediated liver injury by the medicinal plant *Sclerocarya birrea*." *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* **23**(1): 61-72.
- Fox, S. W. and T. J. Chambers (2000). "Interferon-gamma directly inhibits TRANCE-induced osteoclastogenesis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **276**(3): 868-872.
- Franceschelli, S., M. Pesce, et al. (2011). "Licocalchone-C extracted from *Glycyrrhiza glabra* inhibits lipopolysaccharide-interferon-gamma inflammation by improving antioxidant conditions and regulating inducible nitric oxide synthase expression." *Molecules* **16**(7): 5720-5734.
- Freudenburg, W., J. M. Moran, et al. (2010). "Phosphatidylinositol 3-kinase regulates macrophage responses to double-stranded RNA and encephalomyocarditis virus." *Journal of Innate Immunity* **2**(1): 77-86.
- Fu, J., H. Cao, et al. (2008). "An anti-sepsis monomer, 2',5,6',7-tetrahydroxyflavanonol (THF), identified from *Scutellaria baicalensis* Georgi neutralizes lipopolysaccharide in vitro and in vivo." *International journal of Immunopharmacology* **8**(12): 1652-1657.

- Fukumoto, H., Takahashi, H., et al. (2010). A noncompetitive BACE1 inhibitor TAK-070 ameliorates Abeta pathology and behavioral deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. Journal of Neurosciences 30, 11157-11166.
- Funaguchi, N., Y. Ohno, et al. (2007). "Narirutin inhibits airway inflammation in an allergic mouse model." Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 34(8): 766-770.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F., et al., 1995. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. Nature 373, 523-527.
- Gao, C., Holscher, C., Liu, Y.Z., Li, L., 2012. GSK3: a key target for the development of novel treatments for type 2 diabetes mellitus and Alzheimer disease. Reviews in Neuroscience 23, 1-11.
- George, V. C., D. R. Naveen Kumar, et al. (2013). "Comparative Studies to Evaluate Relative in vitro Potency of Luteolin in Inducing Cell Cycle Arrest and Apoptosis in HaCaT and A375 Cells." Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 14(2): 631-637.
- Ghanim, H., C. L. Sia, et al. (2011). "A resveratrol and polyphenol preparation suppresses oxidative and inflammatory stress response to a high-fat, high-carbohydrate meal." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 96(5): 1409-1414.
- Ghosh, A.K., Brindisi, M., Tang, J., 2012. Developing ss-secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. Journal of Neurochemistry 120, 71-83.
- Gingery, A., E. W. Bradley, et al. (2008). "TGF-beta coordinately activates TAK1/MEK/AKT/NFkB and SMAD pathways to promote osteoclast survival." Experimental Cell Research 314(15): 2725-2738.
- Goh, F. Y., N. Upton, et al. (2012). "Fisetin, a bioactive flavonol, attenuates allergic airway inflammation through negative regulation of NF-kappaB." European Journal of Pharmacology 679(1-3): 109-116.
- Greiner, L. L., T. S. Stahly, et al. (2001). "The effect of dietary soy daidzein on pig growth and viral replication during a viral challenge." Journal of Animal Sciences 79(12): 3113-3119.
- Guido, C., D. Whitaker-Menezes, et al. (2012). "Mitochondrial fission induces glycolytic reprogramming in cancer-associated myofibroblasts, driving stromal lactate production, and early tumor growth." Oncotarget 3(8): 798-810.

- Guo, S., J. Yan, et al. (2007). "Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of ROS-NO pathway." Biological Psychiatry **62**(12): 1353-1362.
- Hao, H., H. Gufu, et al. (2012). "Baicalin suppresses expression of TLR2/4 and NF-kappaB in chlamydia trachomatis-infected mice." Immunopharmacol Immunotoxicol **34**(1): 89-94.
- Haramizu, S., N. Ota, et al. (2011). "Catechins attenuate eccentric exercise-induced inflammation and loss of force production in muscle in senescence-accelerated mice." Journal of Applied Physiology **111**(6): 1654-1663.
- Hardy, J., Allsop, D., 1991. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. Trends in Pharmacology Sci **12**, 383-388.
- Harizi, H., F. Chaabane, et al. (2011). "Inhibition of proinflammatory macrophage responses and lymphocyte proliferation in vitro by ethyl acetate leaf extract from *Daphne gnidium*." Cellular Immunology **267**(2): 94-101.
- Heneka, M.T., O'Banion, M.K., 2007. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. Journal of Neuroimmunology **184**, 69-91.
- Hevel, J. M. and M. A. Marletta (1993). "Macrophage nitric oxide synthase: tetrahydrobiopterin decreases the NADPH stoichiometry." Advances in Experimental Medicine and Biology **338**: 285-288.
- Hibbs, J. B., Jr., R. R. Taintor, et al. (1988). "Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule." Biochemical and Biophysical Research Communications **157**(1): 87-94.
- Hikosaka, K., Y. Koyama, et al. (2006). "Reduced lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide production in peritoneal macrophages and inhibited LPS-induced lethal shock in mice by a sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) extract." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **70**(12): 2853-2858.
- Hill, J. R., J. A. Corbett, et al. (1996). "Nitric oxide regulates interleukin 1 bioactivity released from murine macrophages." Journal of Biological Chemistry **271**(37): 22672-22678.
- Hinz, B., K. Brune, et al. (2000). "Nitric oxide inhibits inducible nitric oxide synthase mRNA expression in RAW 264.7 macrophages." Biochemical and Biophysical Research Communications **271**(2): 353-357.
- Hirai, S., Y. I. Kim, et al. (2007). "Inhibitory effect of naringenin chalcone on inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages." Life Sciences **81**(16): 1272-1279.

- Hiransai, P., S. Ratanachaiyavong, et al. (2010). "Dioscorealide B suppresses LPS-induced nitric oxide production and inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages: The inhibition of NF-kappaB and ERK1/2 activation." Journal of Cellular Biochemistry **109**(5): 1057-1063.
- Hirao, K., H. Yumoto, et al. (2010). "Tea catechins reduce inflammatory reactions via mitogen-activated protein kinase pathways in toll-like receptor 2 ligand-stimulated dental pulp cells." Life Sciences **86**(17-18): 654-660.
- Hirohashi, N. and D. C. Morrison (1996). "Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophages modulates LPS-dependent interleukin-6 production in vitro." Infection and Immunity **64**(3): 1011-1015.
- Hirvonen, M. R., K. Huttunen, et al. (2005). "Bacterial strains from moldy buildings are highly potent inducers of inflammatory and cytotoxic effects." Indoor Air **15 Suppl 9**: 65-70.
- Hjorth, E. and Y. Freund-Levi (2012). "Immunomodulation of microglia by docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid." Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care **15**(2): 134-143.
- Holcomb, L., Gordon, M.N., et al. (1998). Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. Nature Medicine **4**, 97-100.
- Hong, K. S., J. I. Park, et al. (2012). "Involvement of SIRT1 in hypoxic down-regulation of c-Myc and beta-catenin and hypoxic preconditioning effect of polyphenols." Toxicology and Applied Pharmacology **259**(2): 210-218.
- Hossain, E., D. Sarkar, et al. (2013). "Effect of methanol extract of *Bombax malabaricum* leaves on nitric oxide production during inflammation." Acta Poloniae Pharmaceutica **70**(2): 255-260.
- Hsiao, K., Chapman, P, et al. (1996). Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. Science **274**, 99-102.
- Hu, S., Q. L. Mao-Ying, et al. (2012). "Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin alleviate bone cancer pain in association with suppressing expression of spinal proinflammatory cytokines." Journal of Neuroinflammation **9**: 278.
- Huang, F., K. Liu, et al. (2012). "Puerarin attenuates endothelial insulin resistance through inhibition of inflammatory response in an IKKbeta/IRS-1-dependent manner." Biochimie **94**(5): 1143-1150.
- Hull, M., E. Lee, et al. (2013). "Lithium chloride induces TNFalpha in mouse macrophages via MEK-ERK-dependent pathway." Journal of Cellular Biochemistry.

- Hwang, T. L., G. L. Li, et al. (2009). "Potent inhibition of superoxide anion production in activated human neutrophils by isopedicin, a bioactive component of the Chinese medicinal herb *Fissistigma oldhamii*." Free Radical Biology and Medicine **46**(4): 520-528.
- Ibrahim, A. S., M. M. El-Shishtawy, et al. (2010). "Genistein attenuates retinal inflammation associated with diabetes by targeting of microglial activation." Molecular Vision **16**: 2033-2042.
- Ichiryu, N. and P. J. Fairchild (2013). "Immune privilege of stem cells." Methods in Molecular Biology **1029**: 1-16.
- Ingram, J. L. and M. Kraft (2012). "IL-13 in asthma and allergic disease: asthma phenotypes and targeted therapies." Journal of Allergy and Clinical Immunology **130**(4): 829-842; quiz 843-824.
- Iqbal, K., Liu, F, et al (2009). Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. Acta Neuropathology **118**, 53-69.
- Irizarry, M.C., McNamara, M., et al (1997a). APPSw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology **56**, 965-973.
- Irizarry, M.C., Soriano, F., et al (1997b). Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. Journal of Neuroscience **17**, 7053-7059.
- Janus, C., Pearson, J., McLaurin, et al (2000b). A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. Nature **408**, 979-982.
- Jefremov, V., M. Zilmer, et al. (2007). "Antioxidative effects of plant polyphenols: from protection of G protein signaling to prevention of age-related pathologies." Annals of the New York Academy of Science **1095**: 449-457.
- Jeong, G. S., D. S. Lee, et al. (2010). "Effects of sappanchalcone on the cytoprotection and anti-inflammation via heme oxygenase-1 in human pulp and periodontal ligament cells." European Journal of Pharmacology **644**(1-3): 230-237.
- Jeoung, B. R., K. D. Lee, et al. (2013). "Ganghwaljetongyeum, an anti-arthritis remedy, attenuates synoviocyte proliferation and reduces the production of proinflammatory mediators in macrophages: the therapeutic effect of GHJTY on rheumatoid arthritis." BMC Complementary and Alternative Medicine **13**: 47.

- Ji, J., S. L. Hu, et al. (2013). "Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* mediate M1 macrophage polarization in mouse bone marrow-derived macrophages." Archives of Microbiology **195**(5): 349-356.
- John, C. M., P. Sandrasaigaran, et al. (2011). "Immunomodulatory activity of polyphenols derived from *Cassia auriculata* flowers in aged rats." Cellular Immunology **271**(2): 474-479.
- Johnson, C. E., F. O. Oladeinde, et al. (2008). "Comparative Assessment of Total Phenolic Content in Selected Medicinal Plants." Nigerian Journal of Natural Products and Medicine **12**: 40-42.
- Johnstone, S. E. and S. B. Baylin (2010). "Stress and the epigenetic landscape: a link to the pathobiology of human diseases?" Nature Reviews Genetics **11**(11): 806-812.
- Joven, J., A. Rull, et al. (2013). "Multifunctional targets of dietary polyphenols in disease: a case for the chemokine network and energy metabolism." Food and Chemical Toxicology **51**: 267-279.
- Jun, C. D., B. M. Choi, et al. (1995). "Involvement of protein kinase C during taxol-induced activation of murine peritoneal macrophages." Journal of Immunology **154**(12): 6541-6547.
- Jung, J. S., K. O. Shin, et al. (2013). "Anti-inflammatory mechanism of exogenous C2 ceramide in lipopolysaccharide-stimulated microglia." Biochimica et Biophysica Acta.
- Jungbauer, A. and S. Medjakovic (2012). "Anti-inflammatory properties of culinary herbs and spices that ameliorate the effects of metabolic syndrome." Maturitas **71**(3): 227-239.
- Kalin, R., A. Righi, et al. (2002). "Activin, a grape seed-derived proanthocyanidin extract, reduces plasma levels of oxidative stress and adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin) in systemic sclerosis." Free Radical Research **36**(8): 819-825.
- Kandalepas, P.C., Vassar, R., 2012. Identification and biology of ss-secretase. Journal of Neurochemistry **120**, 55-61.
- Kaneko, T., H. Chiba, et al. (2009). "Effect of *Scutellariae radix* ingredients on prostaglandin E(2) production and COX-2 expression by LPS-activated macrophage." In Vivo **23**(4): 577-581.
- Kang, J. S., Y. D. Yoon, et al. (2005). "Glabridin, an isoflavan from licorice root, inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and improves survival of mice in experimental model of septic shock." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **312**(3): 1187-1194.
- Kanno, S., A. Shouji, et al. (2006). "Inhibitory effect of naringin on lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock in mice and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages." Life Sciences **78**(7): 673-681.

- Kao, T. K., Y. C. Ou, et al. (2010). "Graptopetalum paraguayense E. Walther leaf extracts protect against brain injury in ischemic rats." American Journal of Chinese Medicine **38**(3): 495-516.
- Karou, S. D., T. Tchacondo, et al. (2011). "Antimicrobial, antiplasmodial, haemolytic and antioxidant activities of crude extracts from three selected Togolese medicinal plants." Asian Pacific Journal of Tropical Medicine **4**(10): 808-813.
- Kaur, G., M. Athar, et al. (2008). "Quercus infectoria galls possess antioxidant activity and abrogates oxidative stress-induced functional alterations in murine macrophages." Chemico- Biological Interactions **171**(3): 272-282.
- Kawaguchi, K., H. Maruyama, et al. (2011). "Suppression of inflammatory responses after onset of collagen-induced arthritis in mice by oral administration of the Citrus flavanone naringin." Immunopharmacology and Immunotoxicology **33**(4): 723-729.
- Kawai, T. and S. Akira (2007). "Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors." Trends in Molecular Medicine **13**(11): 460-469.
- Kawaii, S. and E. P. Lansky (2004). "Differentiation-promoting activity of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic leukemia cells." Journal of Medicinal Food **7**(1): 13-18.
- Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Saido, T.C., Shoji, M., Ashe, K.H., Younkin, S.G., 2001. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Journal of Neuroscience **21**, 372-381.
- Kenny, O. M., C. M. McCarthy, et al. (2013). "Anti-inflammatory properties of potato glycoalkaloids in stimulated Jurkat and Raw 264.7 mouse macrophages." Life Sciences **92**(13): 775-782.
- Kim, J. A., G. Formoso, et al. (2007). "Epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol, mediates NO-dependent vasodilation using signaling pathways in vascular endothelium requiring reactive oxygen species and Fyn." Journal of Biological Chemistry **282**(18): 13736-13745.
- Kim, Y. J., H. C. Kim, et al. (2012). "Inhibitory effects of aurenfiacin from *Syzygium samarangense* on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in mouse macrophages." Food and Chemical Toxicology **50**(3-4): 1027-1035.
- Kim, Y. J., Y. A. Kim, et al. (2011). "Pycnogenol modulates apoptosis by suppressing oxidative stress and inflammation in high glucose-treated renal tubular cells." Food and Chemical Toxicology **49**(9): 2196-2201.
- Kim, Y. J., Y. Shin, et al. (2012). "Anethum graveolens flower extracts inhibited a lipopolysaccharide-induced inflammatory response by blocking iNOS expression and NF-kappaB activity in macrophages." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **76**(6): 1122-1127.

- Kiss, A. K., A. Kaplon-Cieslicka, et al. (2012). "Ex vivo effects of an *Oenothera paradoxa* extract on the reactive oxygen species generation and neutral endopeptidase activity in neutrophils from patients after acute myocardial infarction." Phytotherapy Research **26**(4): 482-487.
- Kitamura, M., T. Nishino, et al. (2012). "Epigallocatechin gallate suppresses peritoneal fibrosis in mice." Chemico- Biological Interactions **195**(1): 95-104.
- Kole, L., B. Giri, et al. (2011). "Biochanin-A, an isoflavon, showed anti-proliferative and anti-inflammatory activities through the inhibition of iNOS expression, p38-MAPK and ATF-2 phosphorylation and blocking NFkappaB nuclear translocation." European Journal of Pharmacology **653**(1-3): 8-15.
- Kopec, K. K. and R. T. Carroll (1998). "Alzheimer's beta-amyloid peptide 1-42 induces a phagocytic response in murine microglia." Journal of Neurochemistry **71**(5): 2123-2131.
- Kosik, K.S., Joachim, C.L., Selkoe, D.J., 1986. Microtubule-Associated Protein Tau (Tau) Is a Major Antigenic Component of Paired Helical Filaments in Alzheimer-Disease. Proceedings of the National Academy of Sciences USA **83**, 4044-4048.
- Koyanagi, M., K. Egashira, et al. (2000). "Role of monocyte chemoattractant protein-1 in cardiovascular remodeling induced by chronic blockade of nitric oxide synthesis." Circulation **102**(18): 2243-2248.
- Kriegel, L., M. Vieth, et al. (2012). "Up-regulation of c-MYC and SIRT1 expression correlates with malignant transformation in the serrated route to colorectal cancer." Oncotarget.
- Kubo, M. and Y. Motomura (2012). "Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells." Frontiers in Immunology **3**: 275.
- Kwak, W. J., C. K. Han, et al. (2002). "Effects of Ginkgetin from *Ginkgo biloba* Leaves on cyclooxygenases and in vivo skin inflammation." Planta Medica **68**(4): 316-321.
- Kwon, H. S., J. H. Park, et al. (2008). "Licochalcone A isolated from licorice suppresses lipopolysaccharide-stimulated inflammatory reactions in RAW264.7 cells and endotoxin shock in mice." Journal of Molecular Medicine (Berl) **86**(11): 1287-1295.
- Lacour, S., D. Antonios, et al. (2009). "Acetaminophen and lipopolysaccharide act in synergy for the production of pro-inflammatory cytokines in murine RAW264.7 macrophages." Journal of Immunotoxicology **6**(2): 84-93.
- Larrosa, M., C. Luceri, et al. (2009). "Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models." Molecular Nutrition and Food Research **53**(8): 1044-1054.
- Lavaud, A., R. Soleti, et al. (2012). "Paradoxical effects of polyphenolic compounds from Clusiaceae on angiogenesis." Biochemical Pharmacology **83**(4): 514-523.

- Lee, E. K., J. M. Kim, et al. (2011). "Modulation of NF-kappaB and FOXOs by baicalein attenuates the radiation-induced inflammatory process in mouse kidney." Free Radical Research **45**(5): 507-517.
- Lee, J. P., Y. C. Li, et al. (2010). "Protective effects of luteolin against lipopolysaccharide-induced acute lung injury involves inhibition of MEK/ERK and PI3K/Akt pathways in neutrophils." Acta Pharmacologica Sinica **31**(7): 831-838.
- Lee, Y. M., P. Y. Cheng, et al. (2011). "Baicalein, an active component of *Scutellaria baicalensis* Georgi, improves cardiac contractile function in endotoxaemic rats via induction of heme oxygenase-1 and suppression of inflammatory responses." Journal of Ethnopharmacology **135**(1): 179-185.
- Lee, Y. R., J. H. Jung, et al. (2011). "Hesperidin partially restores impaired immune and nutritional function in irradiated mice." Journal of Medicinal Food **14**(5): 475-482.
- Leray, V., B. Freuchet, et al. (2011). "Effect of citrus polyphenol- and curcumin-supplemented diet on inflammatory state in obese cats." British Journal of Nutrition **106** Suppl 1: S198-201.
- Li, H. Y., Z. Y. Yuan, et al. (2012). "Role of baicalin in regulating Toll-like receptor 2/4 after ischemic neuronal injury." Chinese Medical Journal (Engl) **125**(9): 1586-1593.
- Liao, J. C., J. S. Deng, et al. (2012). "Chemical compositions, anti-inflammatory, antiproliferative and radical-scavenging activities of *Actinidia callosa* var. *ephippioides*." American Journal of Chinese Medicine **40**(5): 1047-1062.
- Lin, Y. L., S. H. Tsai, et al. (1999). "Theaflavin-3,3'-digallate from black tea blocks the nitric oxide synthase by down-regulating the activation of NF-kappaB in macrophages." European Journal of Pharmacology **367**(2-3): 379-388.
- Liu, C. S., C. C. Chang, et al. (2012). "2-hydroxy-4'-methoxychalcone inhibits proliferation and inflammation of human aortic smooth muscle cells by increasing the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma." Journal of Cardiovascular Pharmacology and therapeutics **59**(4): 339-351.
- Liu, L. L., L. K. Gong, et al. (2008). "Baicalin inhibits macrophage activation by lipopolysaccharide and protects mice from endotoxin shock." Biochemical Pharmacology **75**(4): 914-922.
- Lixuan, Z., D. Jingcheng, et al. (2010). "Baicalin attenuates inflammation by inhibiting NF-kappaB activation in cigarette smoke induced inflammatory models." Pulmonary Pharmacology and Therapeutics **23**(5): 411-419.

- Lopes, G. K., H. M. Schulman, et al. (1999). "Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions." Biochimica et Biophysica Acta **1472**(1-2): 142-152.
- Maezawa, I., P. I. Zimin, et al. (2011). "Amyloid-beta protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity." Journal of Biological Chemistry **286**(5): 3693-3706.
- Mahat, M. Y., N. M. Kulkarni, et al. (2010). "Modulation of the cyclooxygenase pathway via inhibition of nitric oxide production contributes to the anti-inflammatory activity of kaempferol." European Journal of Pharmacology **642**(1-3): 169-176.
- Makanga, B. and O. Odyek (1989). "Mollusc-killing agents from *Khaya grandifoliola*." Tropical Medicine and Parasitology **40**(2): 117-118.
- Manczak, M., Anekonda, T.S., et al. (2006). Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. Human Molecular Genetics **15**, 1437-1449.
- Manczak, M., Mao, P., et al. (2010). Mitochondria-targeted antioxidants protect against amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease neurons. Journal of Alzheimers Disease **20** Suppl 2, S609-631.
- Manna, S. K., R. S. Aggarwal, et al. (2007). "Morin (3,5,7,2',4'-Pentahydroxyflavone) abolishes nuclear factor-kappaB activation induced by various carcinogens and inflammatory stimuli, leading to suppression of nuclear factor-kappaB-regulated gene expression and up-regulation of apoptosis." Clinical Cancer Research **13**(7): 2290-2297.
- Manthey, J. A. and P. Bendele (2008). "Anti-inflammatory activity of an orange peel polymethoxylated flavone, 3',4',3,5,6,7,8-heptamethoxyflavone, in the rat carrageenan/paw edema and mouse lipopolysaccharide-challenge assays." Journal of Agricultural Food Chemistry **56**(20): 9399-9403.
- Marletta, M. A., P. S. Yoon, et al. (1988). "Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate." Biochemistry **27**(24): 8706-8711.
- Martin, A. R., I. Villegas, et al. (2004). "Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats." Biochemical Pharmacology **67**(7): 1399-1410.
- Martin, S., E. Andriambeloson, et al. (2002). "Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production." British Journal of Pharmacology **135**(6): 1579-1587.
- Martinez-Micaelo, N., N. Gonzalez-Abuin, et al. (2012). "Omega-3 docosaehaenoic acid and procyanidins inhibit cyclo-oxygenase activity and attenuate NF-kappaB activation through

- a p105/p50 regulatory mechanism in macrophage inflammation." Biochemical Journal **441**(2): 653-663.
- Massoud, F., Leger, G.C., 2011. Pharmacological treatment of Alzheimer disease. Canadian Journal of Psychiatry **56**, 579-588.
- Mattson, M.P., 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. Nature **430**, 631-639.
- McGeer, P.L., McGeer, E.G., 2002. Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. Journal of Neurovirology **8**, 529-538.
- Medina, M., Avila, J., 2010. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease. Current Pharmaceutical Design **16**, 2790-2798.
- Meeran, S. M., S. Akhtar, et al. (2009). "Inhibition of UVB-induced skin tumor development by drinking green tea polyphenols is mediated through DNA repair and subsequent inhibition of inflammation." Journal of Investigative Dermatology **129**(5): 1258-1270.
- Monteiro, R., C. Calhau, et al. (2008). "Xanthohumol inhibits inflammatory factor production and angiogenesis in breast cancer xenografts." Journal of Cellular Biochemistry **104**(5): 1699-1707.
- Murgas, P., B. Godoy, et al. (2012). "Abeta potentiates inflammatory activation of glial cells induced by scavenger receptor ligands and inflammatory mediators in culture." Neurotoxicology Research **22**(1): 69-78.
- Nairz, M., U. Schleicher, et al. (2013). "Nitric oxide-mediated regulation of ferroportin-1 controls macrophage iron homeostasis and immune function in Salmonella infection." Journal of Experimental Medicine **210**(5): 855-873.
- Nakano, T., M. Masuda, et al. (2012). "Inhibition by polyphenolic phytochemicals and sulfurous compounds of the formation of 8-chloroguanosine mediated by hypochlorous acid, human myeloperoxidase, and activated human neutrophils." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **76**(12): 2208-2213.
- Nalabothula, N. and F. Carrier (2011). "Cancer cells' epigenetic composition and predisposition to histone deacetylase inhibitor sensitization." Epigenomics **3**(2): 145-155.
- Negrao, R., R. Costa, et al. (2012). "Xanthohumol-supplemented beer modulates angiogenesis and inflammation in a skin wound healing model. Involvement of local adipocytes." Journal of Cellular Biochemistry **113**(1): 100-109.
- Nicholas, C., S. Batra, et al. (2007). "Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF-kappaB through the suppression of p65 phosphorylation." Journal of Immunology **179**(10): 7121-7127.

- Nishizawa, M., T. Hara, et al. (2011). "Supplementation with a flavanol-rich lychee fruit extract influences the inflammatory status of young athletes." Phytotherapy Research **25**(10): 1486-1493.
- Oakley, H., Cole, S.L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R., Vassar, R., 2006. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. Journal of Neuroscience **26**, 10129-10140.
- Obidike, I. C. and M. O. Emeje (2011). "Microencapsulation enhances the anti-ulcerogenic properties of Entada africana leaf extract." Journal of Ethnopharmacology **137**(1): 553-561.
- Oh, H. M., S. W. Lee, et al. (2012). "Norkurarinol inhibits toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated pro-inflammatory signaling pathway and rotavirus replication." Journal of Pharmacological Sciences **118**(2): 161-170.
- Oh, J. H., T. J. Lee, et al. (2008). "Withaferin A inhibits iNOS expression and nitric oxide production by Akt inactivation and down-regulating LPS-induced activity of NF-kappaB in RAW 264.7 cells." European Journal of Pharmacology **599**(1-3): 11-17.
- Oh, Y. C., W. K. Cho, et al. (2013). "Anti-inflammatory effect of Sosihotang via inhibition of nuclear factor-kappaB and mitogen-activated protein kinases signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage cells." Food and Chemical Toxicology **53**: 343-351.
- Okenwa, C., A. Kumar, et al. (2013). "SHP-1-Pyk2-Src Protein Complex and p38 MAPK Pathways Independently Regulate IL-10 Production in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages." Journal of Immunology.
- Oliveira, L. T., P. R. Louzada, et al. (2011). "Amyloid-beta decreases nitric oxide production in cultured retinal neurons: a possible mechanism for synaptic dysfunction in Alzheimer's disease?" Neurochemical Research **36**(1): 163-169.
- Oliveira, R. A., C. D. Narciso, et al. (2010). "Effects of feeding polyphenols from pomegranate extract on health, growth, nutrient digestion, and immunocompetence of calves." Journal of Dairy Science **93**(9): 4280-4291.
- Opal, S. M. and V. A. DePalo (2000). "Anti-inflammatory cytokines." Chest **117**(4): 1162-1172.
- Oshiro, T., Y. Shibasaki, et al. (2001). "Immunolocalization of vacuolar-type H⁺-ATPase, cathepsin K, matrix metalloproteinase-9, and receptor activator of NFkappaB ligand in odontoclasts during physiological root resorption of human deciduous teeth." Anatomical Record **264**(3): 305-311.

- Overman, A., A. Bumrungpert, et al. (2010). "Polyphenol-rich grape powder extract (GPE) attenuates inflammation in human macrophages and in human adipocytes exposed to macrophage-conditioned media." International Journal of Obesity (Lond) **34**(5): 800-808.
- Overman, A., C. C. Chuang, et al. (2011). "Quercetin attenuates inflammation in human macrophages and adipocytes exposed to macrophage-conditioned media." International Journal of Obesity (Lond) **35**(9): 1165-1172.
- Oyama, T., Y. Yasui, et al. (2009). "Dietary tricetin suppresses inflammation-related colon carcinogenesis in male Crj: CD-1 mice." Cancer Prevention Research (Phila) **2**(12): 1031-1038.
- Pallares, V., D. Calay, et al. (2012). "Additive, antagonistic, and synergistic effects of procyanidins and polyunsaturated fatty acids over inflammation in RAW 264.7 macrophages activated by lipopolysaccharide." Nutrition **28**(4): 447-457.
- Park, C. M., K. S. Jin, et al. (2011). "Luteolin and chicoric acid synergistically inhibited inflammatory responses via inactivation of PI3K-Akt pathway and impairment of NF-kappaB translocation in LPS stimulated RAW 264.7 cells." European Journal of Pharmacology **660**(2-3): 454-459.
- Park, H. Y., S. K. Ha, et al. (2013). "Narirutin fraction from citrus peels attenuates alcoholic liver disease in mice." Food and Chemical Toxicology **55**: 637-644.
- Park, S. B., M. S. Kim, et al. (2010). "1,2,3,6-tetra-O-galloyl-beta-D-allopyranose gallotannin isolated, from *Euphorbia jolkini*, attenuates LPS-induced nitric oxide production in macrophages." Phytotherapy Research **24**(9): 1329-1333.
- Pasinetti, G. M. (2012). "Novel role of red wine-derived polyphenols in the prevention of Alzheimer's disease dementia and brain pathology: experimental approaches and clinical implications." Planta Medica **78**(15): 1614-1619.
- Pastene, E., H. Speisky, et al. (2009). "In vitro inhibitory effect of apple peel extract on the growth of *Helicobacter pylori* and respiratory burst induced on human neutrophils." Journal of Agricultural Food Chemistry **57**(17): 7743-7749.
- Perrone, L. A., J. A. Belser, et al. (2013). "Inducible nitric oxide contributes to viral pathogenesis following highly pathogenic influenza virus infection in mice." Journal of Infectious Diseases **207**(10): 1576-1584.
- Pettit, L. K., C. Varsanyi, et al. (2013). "Modulating the inflammatory properties of activated microglia with Docosahexaenoic acid and Aspirin." Lipids in Health and Disease **12**(1): 16.
- Pignatelli, P., S. Di Santo, et al. (2006). "Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment." FASEB Journal **20**(8): 1082-1089.

- Qi, S., Y. Xin, et al. (2012). "Ampelopsin reduces endotoxic inflammation via repressing ROS-mediated activation of PI3K/Akt/NF-kappaB signaling pathways." International Journal of Immunopharmacology **12**(1): 278-287.
- Quiney, C., D. Dauzonne, et al. (2004). "Flavones and polyphenols inhibit the NO pathway during apoptosis of leukemia B-cells." Leukemia Research **28**(8): 851-861.
- Qureshi, A. A., X. Tan, et al. (2011). "Inhibition of nitric oxide in LPS-stimulated macrophages of young and senescent mice by delta-tocotrienol and quercetin." Lipids in Health and Disease **10**: 239.
- Rahman, I. and S. Chung (2010). "Dietary polyphenols, deacetylases and chromatin remodeling in inflammation." Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics **3**(4-6): 220-230.
- Ramassamy, C. (2006). "Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets." European Journal of Pharmacology **545**(1): 51-64.
- Ramos-Rodriguez, J. J., M. Pacheco-Herrero, et al. (2013). "Rapid beta-amyloid deposition and cognitive impairment after cholinergic denervation in APP/PS1 mice." Journal of Neuropathology and Experimental Neurology **72**(4): 272-285.
- Ranganathan, P. V., C. Jayakumar, et al. (2013). "Netrin-1 regulates the inflammatory response of neutrophils and macrophages, and suppresses ischemic acute kidney injury by inhibiting COX-2-mediated PGE2 production." Kidney International.
- Rasheed, Z., N. Akhtar, et al. (2010). "Butrin, isobutrin, and butein from medicinal plant *Butea monosperma* selectively inhibit nuclear factor-kappaB in activated human mast cells: suppression of tumor necrosis factor-alpha, interleukin (IL)-6, and IL-8." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **333**(2): 354-363.
- Reddy, P.H., Manczak, M., Mao, P., Calkins, M.J., Reddy, A.P., Shirendeb, U., 2010. Amyloid-beta and mitochondria in aging and Alzheimer's disease: implications for synaptic damage and cognitive decline. Journal of Alzheimers Disease **20** Suppl 2, S499-512.
- Reddy, P.H., McWeeney, S., Park, B.S., Manczak, M., Gutala, R.V., Partovi, D., Jung, Y., Yau, V., Searles, R., Mori, M., Quinn, J., 2004. Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: up-regulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease. Human Molecular Genetics **13**, 1225-1240.
- Richard, N., S. Arnold, et al. (2011). "Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages." Planta Medica **77**(17): 1890-1897.

- Ridnour, L. A., S. Dhanapal, et al. (2012). "Nitric oxide-mediated regulation of beta-amyloid clearance via alterations of MMP-9/TIMP-1." Journal of Neurochemistry **123**(5): 736-749.
- Rieger, A. M., J. D. Konowalchuk, et al. (2012). "Fish and mammalian phagocytes differentially regulate pro-inflammatory and homeostatic responses in vivo." PLoS One **7**(10): e47070.
- Rigacci, S., V. Guidotti, et al. (2011). "Aβ(1-42) aggregates into non-toxic amyloid assemblies in the presence of the natural polyphenol oleuropein aglycon." Current Alzheimer Research **8**(8): 841-852.
- Roberson, E.D., Mucke, L., 2006. 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. Science **314**, 781-784.
- Rojanathammanee, L., K. L. Puig, et al. (2013). "Pomegranate polyphenols and extract inhibit nuclear factor of activated T-cell activity and microglial activation in vitro and in a transgenic mouse model of Alzheimer disease." Journal of Nutrition **143**(5): 597-605.
- Romier-Crouzet, B., J. Van De Walle, et al. (2009). "Inhibition of inflammatory mediators by polyphenolic plant extracts in human intestinal Caco-2 cells." Food and Chemical Toxicology **47**(6): 1221-1230.
- Ross, C. L. and B. S. Harrison (2013). "Effect of pulsed electromagnetic field on inflammatory pathway markers in RAW 264.7 murine macrophages." Journal of Inflammatory Research **6**: 45-51.
- Rossi, M., F. Caruso, et al. (2013). "Probing antioxidant activity of 2'-hydroxychalcones: Crystal and molecular structures, in vitro antiproliferative studies and in vivo effects on glucose regulation." Biochimie.
- Sae-Wong, C., H. Matsuda, et al. (2011). "Suppressive effects of methoxyflavonoids isolated from *Kaempferia parviflora* on inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells." Journal of Ethnopharmacology **136**(3): 488-495.
- Sakai, N., S. Kaufman, et al. (1993). "Tetrahydrobiopterin is required for cytokine-induced nitric oxide production in a murine macrophage cell line (RAW 264)." Molecular Pharmacology **43**(1): 6-10.
- Sanchez-Fidalgo, S., M. S. da Silva, et al. (2013). "Abarema cochliacarpus reduces LPS-induced inflammatory response in murine peritoneal macrophages regulating ROS-MAPK signal pathway." Journal of Ethnopharmacology.
- Sardi, F., Fassina, L., Venturini, L., Inguscio, M., Guerriero, F., Rolfo, E., Ricevuti, G., 2011. Alzheimer's disease, autoimmunity and inflammation. The good, the bad and the ugly. Autoimmune Reviews **11**, 149-153.

- Schneider-Stock, R., A. Ghantous, et al. (2012). "Epigenetic mechanisms of plant-derived anticancer drugs." Frontiers in Biosciences **17**: 129-173.
- Selkoe, D.J., 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiology Reviews **81**, 741-766.
- Selkoe, D.J., 2000. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. Annals of the New York Academy of Sciences **924**, 17-25.
- Selkoe, D.J., 1998. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. Trends in Cell Biology **8**, 447-453.
- Scheuner, D., Eckman, C., et al. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. Natural Medicine **2**, 864-870.
- Schmitz, C., Rutten, B.P., et al. (2004). Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. American Journal of Pathology **164**, 1495-1502.
- Scholtzova, H., Wadghiri, et al. (2008). Memantine leads to behavioral improvement and amyloid reduction in Alzheimer's-disease-model transgenic mice shown as by micromagnetic resonance imaging. Journal of Neuroscience Research **86**, 2784-2791.
- Shanmugam, K., L. Holmquist, et al. (2008). "Plant-derived polyphenols attenuate lipopolysaccharide-induced nitric oxide and tumour necrosis factor production in murine microglia and macrophages." Molecular Nutrition and Food Research **52**(4): 427-438.
- Sherrington, R., Rogaev, E.I., et al. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. Nature **375**, 754-760.
- Shieh, D. E., L. T. Liu, et al. (2000). "Antioxidant and free radical scavenging effects of baicalein, baicalin and wogonin." Anticancer Research **20**(5A): 2861-2865.
- Si-Si, W., L. Liao, et al. (2011). "Inhibition of TNF-alpha/IFN-gamma induced RANTES expression in HaCaT cell by naringin." Pharmaceutical Biology **49**(8): 810-814.
- Sinha, M., D. K. Das, et al. (2012). "Epicatechin ameliorates ionising radiation-induced oxidative stress in mouse liver." Free Radical Research **46**(7): 842-849.
- Soromou, L. W., N. Chen, et al. (2012). "Astragaloside attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by down-regulating NF-kappaB signaling pathway." Biochemical and Biophysical Research Communications **419**(2): 256-261.
- Stone, D. K., T. Kiyota, et al. (2012). "A model of nitric oxide induced alpha-synuclein misfolding in Parkinson's disease." Neuroscience Letters **523**(2): 167-173.

- Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., et al. (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A **94**, 13287-13292.
- Su, D., Y. Zhao, et al. (2012). "Isoflurane exposure during mid-adulthood attenuates age-related spatial memory impairment in APP/PS1 transgenic mice." PLoS One **7**(11): e50172.
- Suchankova, G., L. E. Nelson, et al. (2009). "Concurrent regulation of AMP-activated protein kinase and SIRT1 in mammalian cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **378**(4): 836-841.
- Sundaresan, N. R., M. Gupta, et al. (2009). "Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice." Journal of Clinical Investigations **119**(9): 2758-2771.
- Sung, Y. J., J. H. Hotchkiss, et al. (1991). "L-arginine-dependent production of a reactive nitrogen intermediate by macrophages of a uricotelic species." Journal of Leukocyte Biology **50**(1): 49-56.
- Sveinbjornsson, B., R. Olsen, et al. (1996). "Macrophage cytotoxicity against murine meth A sarcoma involves nitric oxide-mediated apoptosis." Biochemical and Biophysical Research Communications **223**(3): 643-649.
- Tan, A. C., I. Konczak, et al. (2011). "Potential antioxidant, antiinflammatory, and proapoptotic anticancer activities of Kakadu plum and Illawarra plum polyphenolic fractions." Nutrition and Cancer **63**(7): 1074-1084.
- Tanaka, T., T. Tanaka, et al. (2012). "Cancer chemoprevention by citrus pulp and juices containing high amounts of beta-cryptoxanthin and hesperidin." Journal of Biomedicine and Biotechnology **2012**: 516981.
- Tayeh, M. A. and M. A. Marletta (1989). "Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor." Journal of Biological Chemistry **264**(33): 19654-19658.
- Tominari, T., M. Hirata, et al. (2012). "Polymethoxy flavonoids, nobiletin and tangeretin, prevent lipopolysaccharide-induced inflammatory bone loss in an experimental model for periodontitis." Journal of Pharmacological Sciences **119**(4): 390-394.
- Townley, R. G., M. Sapkota, et al. (2011). "IL-13 and its genetic variants: effect on current asthma treatments." Discovery Medicine **12**(67): 513-523.
- Toyoda-Hokaiwado, N., Y. Yasui, et al. (2011). "Chemopreventive effects of silymarin against 1,2-dimethylhydrazine plus dextran sodium sulfate-induced inflammation-associated

- carcinogenicity and genotoxicity in the colon of gpt delta rats." Carcinogenesis **32**(10): 1512-1517.
- Tran, T. D., H. Park, et al. (2009). "Inhibitory activity of prostaglandin E2 production by the synthetic 2'-hydroxychalcone analogues: Synthesis and SAR study." Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters **19**(6): 1650-1653.
- Vafeiadou, K., D. Vauzour, et al. (2009). "The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury." Archives of Biochemistry and Biophysics **484**(1): 100-109.
- Valsecchi, A. E., S. Franchi, et al. (2011). "The soy isoflavone genistein reverses oxidative and inflammatory state, neuropathic pain, neurotrophic and vasculature deficits in diabetes mouse model." European Journal of Pharmacology **650**(2-3): 694-702.
- Van Marum, R.J., 2009. Update on the use of memantine in Alzheimer's disease. Neuropsychiatric Disease and Treatment **5**, 237-247.
- Vanden Berghe, W. (2012). "Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: lifelong remodeling of our epigenomes." Pharmacological Research **65**(6): 565-576.
- Velliquette, R.A., O'Connor, T., Vassar, R., 2005. Energy inhibition elevates beta-secretase levels and activity and is potentially amyloidogenic in APP transgenic mice: possible early events in Alzheimer's disease pathogenesis. Journal of Neuroscience **25**, 10874-10883.
- Villegas, I., C. La Casa, et al. (2003). "Effects of dosmalfate, a new cytoprotective agent, on acute and chronic trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats." European Journal of Pharmacology **460**(2-3): 209-218.
- Visconti, R. and D. Grieco (2009). "New insights on oxidative stress in cancer." Current Opinion in Drug Discovery and Development **12**(2): 240-245.
- Waetzig, V., K. Czeloth, et al. (2005). "c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia." Glia **50**(3): 235-246.
- Wang, C., X. Liu, et al. (2013). "ZFP64 promotes TLR-triggered pro-inflammatory and type I interferon production in macrophages by enhancing p65 activation." Journal of Biological Chemistry.
- Wang, C. Y., J. W. Xie, et al. (2013). "Trientine Reduces BACE1 Activity and Mitigates Amyloidosis Via the AGE/RAGE/NF-kappaB Pathway in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease." Antioxidant and Redox Signaling.
- Wattanapenpaiboon, N. and M. W. Wahlqvist (2003). "Phytonutrient deficiency: the place of palm fruit." Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition **12**(3): 363-368.

- Weggen, S., Eriksen, J.L., Das, P., Sagi, S.A., Wang, R., Pietrzik, C.U., Findlay, K.A., Smith, T.E., Murphy, M.P., Bulter, T., Kang, D.E., Marquez-Sterling, N., Golde, T.E., Koo, E.H., 2001. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. Nature 414, 212-216.
- Weinreb, O., S. Mandel, et al. (2004). "Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases." Journal of Nutritional Biochemistry **15**(9): 506-516.
- Wesson, D. W. and D. A. Wilson (2011). "Age and gene overexpression interact to abolish nesting behavior in Tg2576 amyloid precursor protein (APP) mice." Behavioural Brain Research **216**(1): 408-413.
- Wimo, A., Winblad, B., Aguero-Torres, H., von Strauss, E., 2003. The magnitude of dementia occurrence in the world. Alzheimer Disease and Associated Disorders 17, 63-67.
- Wolfe, M.S., 2006. The gamma-secretase complex: Membrane-embedded proteolytic ensemble. Biochemistry-U.S. 45, 7931-7939.
- Wolfe, U., P. R. Esser, et al. (2011). "UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo." Free Radical Biology and Medicine **50**(9): 1081-1093.
- Wu, F., H. Wang, et al. (2012). "Homoplantagin modulates insulin sensitivity in endothelial cells by inhibiting inflammation." Biological and Pharmaceutical Bulletin **35**(7): 1171-1177.
- Wu, J., J. Li, et al. (2011). "Evaluation and discovery of novel synthetic chalcone derivatives as anti-inflammatory agents." Journal of Medicinal Chemistry **54**(23): 8110-8123.
- Wu, J., J. Zhou, et al. (2012). "Attenuation of LPS-induced inflammation by ICT, a derivative of icariin, via inhibition of the CD14/TLR4 signaling pathway in human monocytes." International Immunopharmacology **12**(1): 74-79.
- Xu, C. Q., B. J. Liu, et al. (2010). "Icariin attenuates LPS-induced acute inflammatory responses: involvement of PI3K/Akt and NF-kappaB signaling pathway." European Journal of Pharmacology **642**(1-3): 146-153.
- Xue, H., Y. C. Wang, et al. (2012). "A meta-analysis of interleukin-10 -592 promoter polymorphism associated with gastric cancer risk." PLoS One **7**(7): e39868.
- Yang, E. J., E. Y. Yim, et al. (2009). "Inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by Jeju plant extracts." Interdisciplinary Toxicology **2**(4): 245-249.

- Yang, F., W. J. de Villiers, et al. (1998). "Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model." Journal of Nutrition **128**(12): 2334-2340.
- Yang, Y. T., C. J. Weng, et al. (2009). "Resveratrol analog-3,5,4'-trimethoxy-trans-stilbene inhibits invasion of human lung adenocarcinoma cells by suppressing the MAPK pathway and decreasing matrix metalloproteinase-2 expression." Molecular Nutrition and Food Research **53**(3): 407-416.
- Yoon, J. S., H. J. Lee, et al. (2011). "Quercetin inhibits IL-1beta-induced inflammation, hyaluronan production and adipogenesis in orbital fibroblasts from Graves' orbitopathy." PLoS One **6**(10): e26261.
- Youdim, K. A. and J. A. Joseph (2001). "A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects." Free Radical Biology and Medicine **30**(6): 583-594.
- Yuan, L., X. Zhou, et al. (2012). "Pattern recognition receptors involved in the inflammatory attenuating effects of soybean isoflavone in beta-amyloid peptides 1-42 treated rats." Neuroscience Letters **506**(2): 266-270.
- Yuasa, K., K. Tada, et al. (2012). "Sudachitin, a polymethoxyflavone from Citrus sudachi, suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in mouse macrophage-like RAW264 cells." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **76**(3): 598-600.
- Yun, J. M., I. Jialal, et al. (2010). "Effects of epigallocatechin gallate on regulatory T cell number and function in obese v. lean volunteers." British Journal of Nutrition **103**(12): 1771-1777.
- Zawia, N. H., D. K. Lahiri, et al. (2009). "Epigenetics, oxidative stress, and Alzheimer disease." Free Radical Biology and Medicine **46**(9): 1241-1249.
- Zhan, H., J. Y. Lu, et al. (2001). "Protective effects of tea polyphenols on myocardial free radical metabolic disorder in mice induced by inhalation of pure oxygen under 5500 m hypobaric condition." Space Medicine and Medical Engineering (Beijing) **14**(1): 6-10.
- Zhan, H., J. Y. Lu, et al. (2001). "Protective effects of tea polyphenols on mild hypobaric hypoxia induced pulmonary free radical metabolic disorder in mice." Space Medicine and Medical Engineering (Beijing) **14**(2): 79-83.
- Zhang, F., J. S. Shi, et al. (2010). "Resveratrol protects dopamine neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity through its anti-inflammatory actions." Molecular Pharmacology **78**(3): 466-477.
- Zhang, H., O. A. Odeku, et al. (2008). "Limonoids from the stem bark of *Khaya grandifoliola*." Phytochemistry **69**(1): 271-275.

- Zhang, H. B., J. K. Wen, et al. (2011). "Flavonoids from *Inula britannica* reduces oxidative stress through inhibiting expression and phosphorylation of p47(phox) in VSMCs." Pharmaceutical Biology **49**(8): 815-820.
- Zhang, J., B. Shen, et al. (2007). "Novel strategies for inhibition of the p38 MAPK pathway." Trends in Pharmacological Sciences **28**(6): 286-295.
- Zhang, J., J. Tang, et al. (2013). "The Natural Pesticide Dihydrorotenone Induces Human Plasma Cell Apoptosis by Triggering Endoplasmic Reticulum Stress and Activating p38 Signaling Pathway." PLoS One **8**(7): e69911.
- Zhao, X.L., Wang, W.A., et al. (2010). Expression of beta-amyloid induced age-dependent presynaptic and axonal changes in *Drosophila*. Journal of Neurosciences **30**, 1512-1522.
- Zhou, C., Y. Qiao, et al. (2013). "Purification and characterization of a novel small-molecule polysaccharide from the Maitake medicinal mushroom *Grifola frondosa* (higher Basidiomycetes)." International Journal of Medicinal Mushrooms **15**(2): 145-152.
- Zhu, J., J. Wang, et al. (2012). "Baicalin improves survival in a murine model of polymicrobial sepsis via suppressing inflammatory response and lymphocyte apoptosis." PLoS One **7**(5): e35523.
- Zhu, L. H., W. Bi, et al. (2011). "Luteolin inhibits microglial inflammation and improves neuron survival against inflammation." International Journal of Neuroscience **121**(6): 329-336.
- Zhu, L. H., W. Bi, et al. (2011). "Luteolin reduces primary hippocampal neurons death induced by neuroinflammation." Neurological Research **33**(9): 927-934.
- Zhu, T., D. X. Wang, et al. (2013). "Andrographolide Protects against LPS-Induced Acute Lung Injury by Inactivation of NF-kappaB." PLoS One **8**(2): e56407.

ANNEXE

Culture cellulaire

1. Mesure à prendre avant de retirer les cellules de l'azote liquide

- Préparer le milieu de culture : filtrer 50ml de FBS (fetal bovine serum) + 10ml de pénicilline/streptomycine et ajouter les à 500 ml du milieu RPMI
- Mettre le milieu de culture pendant 10-30 min dans un bain marie chaud à 37 °C
- Mettre la hotte à flux laminaire en marche et la nettoyer avec de l'éthanol 70%
- Préparer un tube de 50ml contenant 15 ml de milieu

2. Introduire le tube contenant les cellules dans le bain marie et introduire son contenu dans un tube de 50ml

3. Centrifuger le tube pendant 5 min à 1000rpm et éliminer le surnageant

4. Préparer une boîte de culture contenant 15 ml de milieu de culture

5. Resuspendre le culot de cellules dans 5 ml de milieu de culture

6. Introduire les cellules dans la boîte de culture et la placer dans un incubateur

Vérifier les cellules chaque jour sous un microscope.

Si les cellules croissent densément, elles sont re-collectées et introduites dans d'autres boîtes de culture.

1. Si les cellules sont adhérentes ; enlever le milieu de culture

2. Laver les cellules avec 10ml de PBS

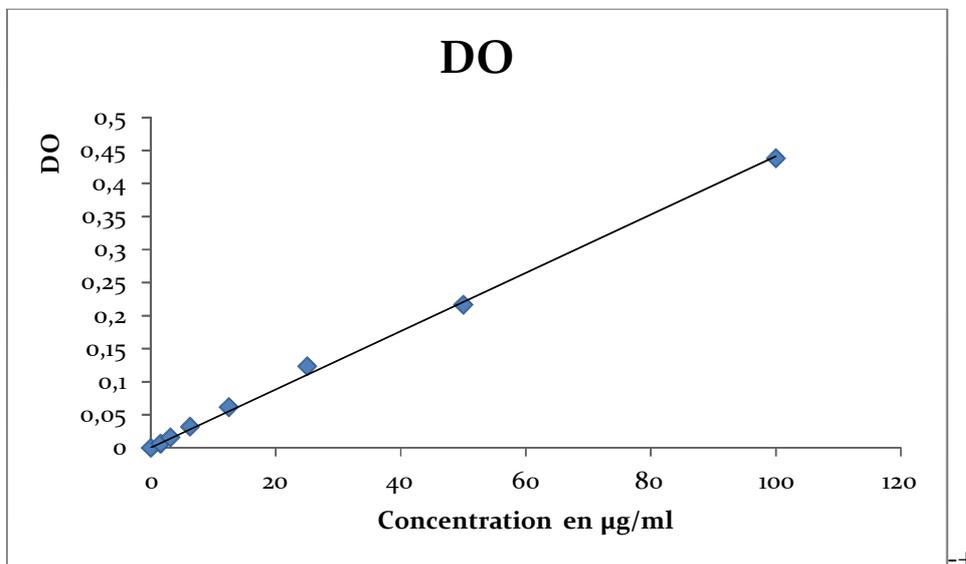
3. Ajouter 2ml de trypsine dans la boîte de culture et l'introduire dans un incubateur pendant 2-5 min

4. Inactiver la trypsine avec un volume de 15ml de milieu de culture

5. Introduire le mélange dans un tube de 50ml

6. Centrifuger le tube pendant 5min à 1000rpm et éliminer le surnageant
7. Préparer des boîtes de culture contenant 15ml de milieu de culture
8. Resuspendre le culot dans 5ml de milieu et les introduire dans les boîtes de culture
9. Placer les boîtes de culture à l'incubateur

Courbe d'étalonnage du NO



Immuno-coloration des hémisphères de cerveaux

1. 30 min chloroforme
2. 1-2 min 100% ; 96% et 70% éthanol
3. Laver dans de l'eau distillée
4. 15 min tampon citrate dans le microonde et ensuite 15-20min à 4⁰
5. Laver dans de l'eau distillée
6. 1-5 min TBS

7. 15 min méthanol/H₂O₂
8. Laver dans de l'eau distillée
9. 1-5 min TBS
10. 15 min 10% swine serum dans du TBS/BSA
11. Anticorps primaire toute la nuit (non-conjugué) à 4° ; dilué dans du TBS/BSA
12. 1-5 min TBS
13. Anticorps secondaire pendant 30 min (biotynilé) 1 :400 avec du TBS/BSA
14. 1-5 min TBS
15. 30 min complexe AB (Avidin et horse radish peroxidase)
16. 1-5 min TBS
17. 15 sec – 2 min coloration avec du DAB (Diaminobenzidine)
18. 1-5 min TBS
19. 15-25 sec hémalum
20. Laver dans de l'eau distillée (seulement quelques secondes ; 1-2 immersions)
21. Laver dans du HCL-alcool (seulement quelques secondes ; 1-2 immersions)
22. 5 min de lavage sous un courant d'eau
23. 1-2 min 70% ; 96% et 100% éthanol
24. 2 fois 2-5 min dans du xylène
25. Montage

Immunocoloration – tampons et solutions

Tampon citrate 10X

21.1 g d'acide citrique monohydraté dans 1000ml d'eau distillée

Ph 6.0

Solution de travail : 1x (1 :10 avec de l'eau distillée)

Méthanol/H₂O₂ (préparer fraîchement)

190 ml méthanol + 6 ml 30% H₂O₂

Swine serum (préparer fraîchement)

10% swine serum dans du TBS/BSA (1 : 10pour 100µl : 10µl swine serum + 90µl TBS/BSA)

TBS/BSA

0.1 % : 1mg BSA (bovine serum albumin) pour 1 ml TBS 1x

TBS 10x

30.3 g Tris-Base

81.8g NaCl

1000ml d'eau distillée

pH 7.5

Solution de travail: 1x (1 : 10 avec de l'eau distillée)

AB-complex (préparer fraîchement ; incuber pendant 30 min à température ambiante avant utilisation)

1µl solution A + 1µl solution B pour 200µl TBS/BSA

Tampon substrat DAB

21g acide citrique monohydraté

34g Imidazole

29.2g NaCl

500ml eau distillée

pH 7.0

Solution DAB (préparer fraîchement ; porter un masque et des gangs)

95- 100 mg DAB

180 ml eau distillée

70µl 30% H₂O₂

20ml tampon substrat

Hemalum (peut être utilisé pendant 2 semaines)

Diluer la solution Mayer's hémalum 1 :1 avec de l'eau distillée ; filtrer avant utilisation

HCl-alcool

0.1% ; 100ml 25% HCl dans 10l éthanol 70%

Test au p38 α

240 ng/ml p38 α MAP kinase

10 μ g/ml ATF-2 comme substrat

100 μ M ATP

60 minutes d'incubation

Un anticorps primaire (1 : 500) polyclonal phospho-ATF-2 (Thr^{69/70})

Un anticorps anti-rabbit IgG conjugué à la phosphatase alcaline (AP) comme anticorps secondaire (1 :4000)

La 4-NPP comme substrat

Test au JNK3

200 ng/ml JNK3 MAP kinase

10 μ g/ml ATF-2 comme substrat

1 μ M ATP

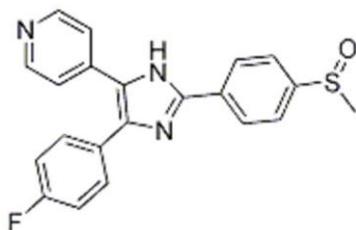
45 minutes d'incubation

Un anticorps primaire (1 : 500) polyclonal phospho-ATF-2 (Thr^{69/70})

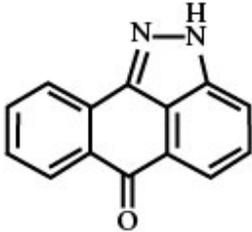
Un anticorps anti-rabbit IgG conjugué à la phosphatase alcaline (AP) comme anticorps secondaire (1 :4000)

La 4-NPP comme substrat

Structure de la SB203580



Structure du SP600125 (Inhibiteur de c-Jun aminoterminal kinase)



JNK-3 Assay

Versuchsdatum: 01.08.2013

Versuchsnummer: J 313-5

Prüfer: K.Bauer, Brice Ayissi

untersuchte Substanzen:

siehe Tabelle

TMB Entwicklungszeit: 4 Min

1 μM ATP aus 100 mM Lösung 10 μL pipettiert

NSB abgezogen

anti-phospho(Thr69/71)-ATF-2-Antikörper **1:5000**

Versuchsbedingungen/Konz. d. LM im Testansatz: 0,01 - 10 μM

Ergebnisse:

Hemmstoff Konz. [μM]	OD				Hemmung [%]
	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Mittelwert	
Baicalin					
Verdünnung 2	0.406	0.425	0.411	0.414	34.164
Verdünnung 3	0.602	0.582	0.551	0.578	8.031
Verdünnung 4	0.618	0.579	0.600	0.599	4.744
Verdünnung 5	0.626	0.555	0.554	0.578	8.031

Kg 25%					
Verdünnung 2	-0.044	-0.054	-0.048	-0.049	107.739
Verdünnung 3	0.263	0.234	0.251	0.249	60.350
Verdünnung 4	0.580	0.541	0.539	0.553	12.006
Verdünnung 5	0.680	0.597	0.560	0.612	2.624
SP 600125					
10	-0.002	-0.024	-0.030	-0.019	103.0
1	0.062	0.048	0.042	0.051	91.9
0.1	0.378	0.402	0.310	0.363	42.2
0.01	0.539	0.519	0.475	0.511	18.7
Max. Aktivität	0.670	0.668	0.662		
	0.611	0.610	0.552	0.629	
	-	-	-		

HE staining

1. 30 min chloroforme
2. 2 min 100% éthanol
3. 2 min 100% éthanol
4. 2 min 96% éthanol
5. 2 min 70% éthanol
6. Laver dans de l'eau distillée
7. 1 min hémalum
8. 10 min lavage sous un robinet à eau coulante
9. 1 min érythrosine
10. Lavage dans de l'eau distillée

11. 1 min 70% éthanol

12. 1 min 96% éthanol

13. 1 min 100% éthanol

14. 1 min 100% éthanol

15. 2 min xylène

16. 2 min xylène

17. Montage

Erythrosine : 200 ml e.d, 200 μ l 100% acide acétique, 200mg Erythrosin (préparer fraîchement)

Hemalum : diluer la solution d'hémalum 1 :1 avec de l'eau distillée, filtrer avant usage (peut être utilisée pendant 2 semaines)

SDS PAGE

Solution	Gel de séparation (5ml par gel)	Stacking gel (3ml par gel)
Mélange acrylamide; 30%	1.75 ml	450 μ l
Tris/HCl; 1.5 M; pH 8.8	1.25 ml	
Tris/HCl; 1 M; pH 6.8		750 μ l
H ₂ O	1.9 ml	1.71 ml
SDS 10%	50 μ l	30 μ l
APS 10%	50 μ l	30 μ l
TEMED	5 μ l	3 μ l

Loading buffer stock:

10ml: 3ml Glycérol

2.4 ml 25% (w/v) SDS (ou 0.6 g de poudre)

0.15 mg bleue de Bromophénol

3.75 ml 0.5M Tris/HCl pH 6.8

Pour obtenir le loading buffer 3x : Juste avant usage mélanger 200µl 1M DTT+ 500µl de la solution stock de loading buffer

10 x SDS-PAGE running buffer

250 mM Tris base

1.92 M Glycine

1% (w/v) SDS

10x transfer buffer

250 mM Tris base

1.92 M Glycine

Pour 1x 20% (v/v) Méthanol

Solution de Ponceau S Red

0.1% (w/v) Ponceau S Red dans 5% (v/v) d'acide acétique

10 xTBS

200mM Tris/HCl pH 7.5

1.5 M NaCl

1x TBST: 1x TBS + 0.1% (v/v) Tween 20

Tampon Tris pH 9.5

150 mM Tris/HCl pH9.5

5Mm MgCl₂

100Mm NaCl

200x BCIP : 50 mg/ml 5-Bromo-4chloro-3-indolyphosphate dans du Diméthylformamide ;
conserver à -20°C

200x NBT : 50 mg/ml Nitobleuetetrazolium-chloride dans 70% Diméthylformamide ; conserver
à -20°C.

Tableau: Teneurs (mgEAC/g d'extrait) en polyphénols des différentes fractions et extraits bruts de
KG et EA.

Fraction s KG	FC	F5	F10	F25	FMeOH	EB
Teneurs	10.32 ±0.20	13.10±0.1 1	32.205±2.0 6	38.40±0.0 3	31.72±0.60	38.93±0.45
Fraction s EA	FC	F5	F10	F25	FMeOH	EB
Teneurs	6.03±0.0 6	27.43±0.5 7	29.01±0.71	41.37±0.2 0	39.293±0.6 8	36.039±0.8 2

Les Valeurs sont les moyennes ± écart-type de 3 essais différents.

EAC : Equivalent acide chlorogénique