

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

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

UNITE DE RECHERCHE EN SCIENCES
DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING
SCHOOL FOR LIFE SCIENCE, HEALTH
AND ENVIRONMENT

DOCTORATE TRAINING OF LIFE
SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE NUTRITION ET DE BIOCHIMIE NUTRITIONNELLE

LABORATORY OF NUTRITION AND NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY

**Activités anticholinestérasique, neuroprotectrice et
neurorégénératrice de l'extrait hydroéthanolique
d'*Autranella congolensis* (sapotaceae)**

THESE

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

Spécialité : Sciences des Aliments et Nutrition, **Option :** Nutrition

Par :

NGOUMEN NGASSA Dany Joël

Matricule 06R728

Master-ès Sciences

Sous la direction de :

NGONDI Judith Laure

Maître de Conférences

Université de Yaoundé I

OBEN Julius ENYONG

Professeur

Université de Yaoundé I

Année académique

2021-2022



UNIVERSITÉ DE YAOUNDE I

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

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

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

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

RESEARCH AND DOCTORATE TRAINING
UNIT IN LIFE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

ATTESTATION DE CORRECTION

Nous, soussignés Pr. NJAYOU Frédéric Nico et Pr. MOUNDIPA FEWOU Paul respectivement Examineur et Président du jury de Thèse de Doctorat/Ph.D en Biochimie spécialité Sciences des Aliments et Nutrition, soutenue par Monsieur NGOUMEN NGASSA Dany Joël (Matricule 06R728) le Mardi 01 Février 2022 à 09 heures dans la Salle de l'Annexe de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, sous le thème : "Activités anticholinestérasique, neuroprotectrice et neurorégénératrice de l'extrait hydroéthanolique d'*Autranella congolensis* (Sapotaceae)", attestons que le candidat a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.

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

Fait à Yaoundé, le... 23 MARS 2022

Examineur


Prof. Njyou Frédéric Nico
Associate Professor - Maître de Conférences
The University of Yaoundé I

Président du jury

Moundipa Fewou Paul
DSCG, Etat
Professor
Enzymology-Toxicology

Prof. Moundipa Fewou Paul
Professor
Enzymology-Toxicology

LISTE PROTOCOLAIRE

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 PERMANENT TEACHING STAFF	

ANNÉE ACADEMIQUE 2021/2022

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 22 septembre 2021

ADMINISTRATION

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

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

VICE-DOYEN / DSSE : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*

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

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Florentine Marie Chantal,
Maître de Conférences

Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR :
AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (37)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste

11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE F. M. C.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
17	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
18	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
19	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
20	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
21	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
22	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

23	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
24	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
25	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
25	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
26	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
27	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	KOTUE TAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
30	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
31	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
32	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
33	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
34	PECHANGO NSANGO Sylvain	Chargé de Cours	En poste

33	FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba	Assistant	En poste
34	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Assistant	En poste
35	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
36	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
37	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (52)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	DAARS/FS
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	DZEUFLET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	Vice Doyen/FMSB/UIYI
7	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
9	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
10	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
11	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
12	NOLA Moïse	Professeur	En poste
13	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
14	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE
15	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste

16	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
19	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
20	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
21	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
22	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
23	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

24	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
25	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
26	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
27	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
28	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
29	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
30	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
31	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
32	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
33	METCHI DONFACK MIREILLE FLAURE EPSE GHOUMO	Chargé de Cours	En poste
34	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
35	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
36	NGOULATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
37	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
38	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA

39	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
40	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
41	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
42	YEDE	Chargé de Cours	En poste

43	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
44	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
45	FEUGANG YOUMSSI François	Assistant	En poste
46	FOKAM Alvine Christelle Epse KEGNE	Assistante	En poste
47	GONWOUO NONO Legrand	Assistant	En poste
48	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
49	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
50	MAPON NSANGO Indou	Assistant	En poste
51	NWANE Philippe Bienvenu	Assistant	En poste
52	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

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

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MBOLO Marie	Professeur	En poste
5	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
6	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
7	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

8	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
9	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
12	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI
13	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
14	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
15	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
16	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste

17	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
----	------------------------	-----------------	----------

18	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
19	GONMADGE CHRISTELLE	Chargée de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
21	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
23	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
24	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
25	NSOM ZAMBO EPSE PIAL ANNIE CLAUDE	Chargé de Cours	En poste
26	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste

27	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Assistant	En poste
28	KABELONG BANAHO Louis- Paul-Roger	Assistant	En poste
29	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
30	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
31	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
32	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
33	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (32)

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

11	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
12	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
13	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
14	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
15	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste

16	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
17	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
18	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
19	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste

20	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
21	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
22	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
23	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
24	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
25	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
26	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
27	NEBAH Née NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINPROFF
28	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
29	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste

30	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
31	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
32	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (40)

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

7	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	Vice-Doyen / DPSAA
8	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste

14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	C.E/ MINESUP
20	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	C.S/ MINESUP
21	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
22	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
23	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
24	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
25	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
26	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
27	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

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

33	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
34	MUNVERA MFIFEN Aristide	Assistant	En poste
35	NONO NONO Éric Carly	Assistant	En poste
36	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Assistante	En poste
37	TCHAMGOUE Joseph	Assistant	En poste
38	TSAFFACK Maurice	Assistant	En poste
39	TSAMO TONTSA Armelle	Assistante	En poste
40	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (22)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div. MINESUP</i>
---	--------------------	------------	--------------------------

2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA.MINESUP</i>
---	--------------------------------	------------	--

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
---	---------------	--------------------------	----------

4	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
5	AMINOU Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
6	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
7	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
8	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
10	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
11	MONTHÉ DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
12	OLE OLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	Directeur adjoint Enset. Ebolowa
13	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
14	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste

16	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
17	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
18	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
19	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
20	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
21	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
22	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (35)

1	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	Chef de Département
2	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>Inspecteur MINESUP</i>

3	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
4	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
7	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef service des programmes & Diplômes/FS/UIYI</i>
8	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda

9	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste
---	------------------------	-----------------------	----------

10	BOGSO ANTOINE MARIE	Chargé de Cours	En poste
11	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
12	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
16	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
17	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
18	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
19	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
20	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
21	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
22	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
23	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste

26	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
27	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
28	LOUMNGAM KAMGA Victor	Assistant	En poste
29	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
30	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
31	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
32	OGADOA AMASSAYOGA	Assistant	En poste
33	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste
34	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (21)

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

4	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
6	KOUITCHEU MABEKU Epse KOUAM Laure Brigitte	Maître de Conférences	En poste

7	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
8	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

9	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
10	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
11	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste

14	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
15	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
16	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
17	MONI NDEDI Esther Del Florence	Assistante	En poste
18	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
19	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
20	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Assistante	En poste
21	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (44)

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

16	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
17	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18	ENYEGUE A NYAM épse	Maître de	En poste

19	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
20	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
21	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
22	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
23	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
24	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
25	SAIDOU	Maître de Conférences	Chef de centre/IRGM/MINRESI
26	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
29	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UYI</i>

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

39	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
40	DJIOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Assistante	En poste
41	LAMARA Maurice	Assistant	En poste
42	OTTOU ABE Martin Thierry	Assistant	En poste
43	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste
44	WANDJI NYAMSI William	Assistant	En poste

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

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste

4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NGOS III Simon	Professeur	En poste
6	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

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

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

42	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
43	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

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

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	8 (01)	14 (10)	13 (05)	05 (02)	40 (18)
BPA	15 (01)	8 (06)	19 (06)	10 (03)	52 (16)
BPV	07 (01)	9 (01)	10 (08)	07 (01)	33 (11)
CI	10 (01)	09 (02)	10 (02)	03 (0)	32 (5)
CO	6 (0)	21 (05)	05 (02)	08 (02)	40 (9)
IN	2 (0)	1 (0)	12 (01)	07 (00)	22 (1)
MAT	2 (0)	7 (0)	15 (01)	09 (02)	33 (7)
MIB	3 (0)	5 (03)	06 (01)	06 (02)	20 (6)
PHY	15 (0)	14 (02)	09 (03)	08 (03)	46 (8)
ST	7 (1)	15 (01)	19 (06)	02 (0)	43 (8)
Total	75 (5)	103 (30)	118 (35)	65 (15)	361 (89)

Soit un total de **361 (89)** dont :

- Professeurs **75 (5)**
- Maîtres de Conférences **103 (30)**
- Chargés de Cours **118 (35)**
- Assistants **65 (15)**

() = Nombre de Femmes **89**

DEDICACES

A ma grand-mère ZEUGANG Elisabeth

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, c'est avec émotion que je tiens à remercier tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à sa réalisation. En particulier :

OBEN E. Julius, Professeur à l'Université de Yaoundé I, co-directeur de thèse, qui m'a accueilli avec enthousiasme dans son laboratoire et qui m'a témoigné sa confiance. Je suis grandement reconnaissant d'avoir travaillé à vos côtés. Vous m'avez encadré avec ouverture pour les nouveaux défis. Tout en étant une inspiration et poussant ma réflexion, vous avez su m'encourager, être disponible et me conseiller à chaque étape du parcours. Votre bonne humeur et votre enthousiasme face aux difficultés que j'ai pu rencontrer ont été une source de motivation.

NGONDI Judith L., Maître de Conférences à l'Université de Yaoundé I, co-directeur de thèse, pour m'avoir fait bénéficier tout au long de la thèse de ses critiques, de ses conseils de son savoir ainsi que de sa riche expérience. Je vous remercie également pour l'aide à la rédaction de la thèse et pour les discussions fructueuses que nous avons eues qui m'ont beaucoup appris et m'ont permis à bien mener ce travail.

MOUNDIPA Paul, Professeur à l'Université de Yaoundé I et Chef du Département de Biochimie ainsi que **les enseignants** du dit Département, qui par leurs remarques constructives et leurs conseils ont contribué à la cohérence de ce projet de thèse.

Tous les membres de l'équipe de recherche du Laboratoire de Nutrition et de Biochimie Nutritionnelle, pour leur assistance et pour avoir participé chacun à leur façon à rendre ces années de thèse exceptionnelles.

Le projet YaBiNAPA financé par la DAAD à l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé I (ENS), pour la caractérisation phytochimique de l'extrait hydroéthanolique d'*Autranella congolensis*.

Le Laboratoire de Physiologie Animale du Département de Physiologie et Biologie Animales de l'Université de Yaoundé I, pour avoir contribué à la réalisation des études histopathologiques et neuro-comportementales.

Ma famille, mes beaux-frères et amis pour leurs soutiens et encouragements.

TABLE DES MATIERES

LISTE PROTOCOLAIRE	i
DEDICACES	xiv
REMERCIEMENTS	xv
TABLE DES MATIERES	xvi
LISTE DES ABREVIATIONS	xxi
LISTE DES FIGURES	xxiv
LISTE DES TABLEAUX	xxviii
RESUME	xxix
ABSTRACT	xxx
INTRODUCTION	xxxi
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITERATURE	4
I.1. Le vieillissement cérébral	4
I.1.1. Le vieillissement	4
I.1.2. Le déclin cognitif lié à l'âge	4
I.1.2.1. Les fonctions cognitives affectées	4
I.1.2.1.1. L'hippocampe structure cérébrale impliquée dans la mémoire	4
I.1.2.1.2. Le déclin cognitif	5
I.1.2.2. Les modifications morphologiques cérébrales et altération de la mémoire ...	6
I.1.2.2.1. Les modifications morphologiques	6
I.1.2.2.2. Altération des mémoires	6
I.1.3. Le déclin cognitif léger (MCI) : un état précurseur de la MA	7
I.2. La maladie d'Alzheimer	8
I.2.1. Diagnostiquer la maladie d'Alzheimer	8
I.2.2. Neuropathologie caractéristique de la maladie d'Alzheimer	8
I.2.2.1. Les lésions histologiques	8

I.2.2.2. L'atrophie cérébrale.....	12
I.2.3. Autres caractéristiques neuropathologiques.....	13
I.2.3.1. Dysfonctionnement du métabolisme du cholestérol	13
I.2.3.1.1. Les lipides	13
I.2.3.1.2. Métabolisme du cholestérol cérébral	14
I.2.3.1.3. Localisation et trafic du cholestérol cellulaire	16
I.2.3.2.4. Taux de cholestérol chez les patients atteints de la MA	17
I.2.3.2.5. Modulation des taux de cholestérol : impact sur la MA	18
I.2.3.2. Implication du stress oxydant dans la pathogénie de la MA	19
I.2.3.2.1. Le stress oxydant	19
I.2.3.2.2. Stress oxydatif et la maladie d'Alzheimer	23
I.2.3.3. Aluminium et maladie d'Alzheimer	27
I.2.3.4. Perturbation de l'homéostasie calcique	28
I.2.3.4.1. Homéostasie du calcium intracellulaire.....	28
I.2.3.4.2. Perturbation de l'homéostasie calcique	29
I.2.3.5. Altérations de la neurotransmission cholinergique	29
I.2.4. Facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer et traitements disponibles.....	30
I.2.4.1. Facteurs de risque.....	30
I.2.4.1.1. Facteurs de risque non modifiables	30
I.2.4.1.2. Facteurs de risque modifiables	31
I.2.4.2. Les traitements.....	31
I.2.5. Modèles animaux de la MA	32
I.2.5.1. Modèles transgéniques	32
I.2.5.2. Modèles d'injection intracrânienne de peptides amyloïdes	32
I.2.5.3. Modèles de neurotoxicité aux métaux cas de l'aluminium	33
I.3. Vers une approche nutritionnelle préventive du vieillissement pathologique.....	33
I.3.1. Contexte.....	33
I.3.2. Les polyphénols, des molécules naturelles d'intérêt thérapeutique.....	35

I.3.2.1. Définitions.....	35
I.3.2.2. Structure et classification.....	36
I.3.2.3. Propriétés biologiques	41
I.3.3. Les triterpènes	43
I.3.4. Les sapotacées : plantes riches en molécules neuroprotectrices	43
I.3.4.1. Description de la famille et quelques composés neuroprotecteurs isolés des plantes de cette famille	43
I.3.4.2. Arganier plante de la famille des sapotacées ayant démontrée des activités neuroprotectrices.....	45
I.4. <i>Austranella congolensis</i> (sapotacée)	45
I.4.1. Description botanique	45
I.4.2. Usages	47
I.4.3. Travaux antérieurs sur les écorces d' <i>Austranella congolensis</i>	47
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	49
II.1. Matériel	49
II.1.1. Matériel végétal.....	49
II.1.2. Matériel animal	49
II.1.3. Matériel de laboratoire.....	50
II.1.3.1. Appareillage.....	50
II.1.3.2. Réactifs	50
II.2. Méthodes	52
II.2.1. Préparation des extraits de la plante.....	52
II.2.2. Dosages des composés bioactifs d'intérêt.....	52
II.2.3. Mesure du potentiel antioxydant <i>in vitro</i> des extraits	54
II.2.3.1. Capacité antioxydante totale (C.A.T).....	54
II.2.3.2. Piégeage du radical 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH*).....	55
II.2.3.3. Piégeage du radical oxyde nitrique (NO*)	56
II.2.3.4. Capacité chélatrice des ions ferreux.....	57

II.2.4. Analyse phytochimique de l'extrait le plus actif par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse.	57
II.2.5. Etude <i>in vivo</i> sur un modèle animal de neurotoxicité.....	58
II.2.5.1. Modèle expérimental.....	58
II.2.5.2. Etudes neuro-comportementales	59
II.2.5.2.1. Mémoire de reconnaissance à court et à long terme par le « Objet recognition test »	59
II.2.5.2.2. Mémoire spatiale par le test du « Morris Water Maze ».....	61
II.2.5.2.3. Coordination motrice par le « Wire-Suspension Grip/Agility Test »	62
II.2.5.3. Sacrifice, prélèvement et préparation des tissus	63
II.2.5.3.1. Sacrifice et prélèvement des tissus.....	63
II.2.5.3.2. Préparation des tissus	63
II.2.5.4. Analyses biochimiques.....	65
II.2.5.4.1. Dosage des marqueurs du stress oxydant	65
II.2.5.4.2. Dosages des marqueurs de la transmission cholinergique, de l'homéostasie du calcium et dosages des taux de cholestérol total, phospholipides totaux, plasmalogènes, triglycérides.....	73
II.2.5.4.3. Dosage des marqueurs du métabolisme du glucose	81
II.2.5.4.5. Dosages de protéines totales	86
II.2.5.5. Etudes histopathologiques.....	87
II.2.5.5. 1. Marquage à l'hématoxyline-éosine (H&E).....	87
II.2.5.5.2. Marquage au crésyl violet	89
II.2.6. Analyses statistiques.....	90
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	91
III.1. Résultats.....	91
III.1.1. Teneurs en composés bioactifs et potentiel antioxydant des extraits aqueux, hydroéthanolique et éthanolique d' <i>A. congolensis</i>	91
III.1.1.1. Teneurs en composés phénoliques	91
III.1.1.2. Potentiel antioxydant des différents extraits	91

III.1.2.1. Composés majoritaires de l'EHEAC	94
III.1.2.2. Effet de L'EHEAC sur les marqueurs du stress oxydant <i>in vivo</i>	97
III.1.3. Effet de l'EHEAC sur la transmission cholinergique, l'homéostasie ionique et les taux de cholestérol et glycérophospholipides cérébraux.....	107
III.1.3.1. Effet de l'EHEAC sur l'activité des cholinestérases	107
III.1.3.2. Effet de l'EHEAC sur l'homéostasie du calcium.....	109
III.1.3.3. Effet sur les taux de cholestérol, phospholipides, plasmalogènes et triglycérides	112
II.1.4. Effets de l'EHEAC sur les modifications structurales de l'hippocampe et sur les paramètres neurocomportementaux.....	120
III.1.4.1. Modifications structurales de l'hippocampe.....	120
III.1.4.1.1. Cartographie des lésions à l'hématoxyline-éosine	120
III.1.4.1.2. Analyse morphométrique des structures de l'hippocampe au crésyl violet	125
III.1.4.2. Effet de l'EHEAC sur les paramètres neurocomportementaux	127
III.1.4.2.1. Effet sur la mémoire de reconnaissance d'objet	127
III.1.4.2.2. Effet sur l'apprentissage et la mémoire spatiale.....	130
III.1.4.2.3. Effet sur la motricité des rates	133
III.1.5. Effet de l'EHEAC sur les paramètres plasmatiques de toxicité et sur la variation de poids corporel et la masse relative des organes	135
III.1.5.1. Effet de l'EHEAC sur les paramètres plasmatiques de toxicité	135
III.1.5.2. Effet de l'EHEAC sur la variation de poids corporel et les masses relatives des organes.....	136
III.2. Discussion.....	137
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	153
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	156
ANNEXES.....	xxxix
ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	xli

LISTE DES ABREVIATIONS

4-HNE : Hydroxynonanal

4-HHE : Hydroxyhexéanal

α 7nAChR : Récepteur α 7 nicotinique à l'acétylcholine, de l'anglais « nicotinic acetylcholine receptor »

AChE : acétylcholinestérase

A β : Peptide amyloïde β

ABCA7 : Membre 7 de la sous famille A des transporteurs ABC

ACAT : Acétyl-CoA AcétylTransferase

AGPI : Acide gras polyinsaturé

AICD : Domaine amyloïde intracellulaire, de l'anglais « Amyloid Intracellular Domain »

ALAT : Alanine aminotransférase

AMP : Adénosine MonoPhosphate

APOE: Apolipoprotéine E

APP : Protéine précurseur du peptide amyloïde β , de l'anglais « Amyloid β Precursor Protein »

ASAT : Aspartate aminotransférase

ATP : Adénosine tri-phosphate

ATPase : Adénosine triphosphatases

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

BACE1 : Autre nom de la β -sécrétase, de l'anglais « β site APP Cleaving Enzyme 1 »

β -CTF : Fragment C terminal β de l'APP, de l'anglais « β C Terminal Fragment »

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BuChE : Butyrylcholinestérase

CALHM1 : Modulateur 1 de l'homéostasie Ca^{2+} , de l'anglais « Ca^{2+} homeostasis modulator 1 ».

CaMKII : Protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante II, de l'anglais « Ca^{2+} /calModulin-dependent protein Kinase II »

CAT : Catalase

CICR : Libération de Ca^{2+} induite par le Ca^{2+} , de l'anglais « Ca^{2+} induced Ca^{2+} release »

DHA : Acide docosahexaénoïque

DNF : Dégénérescence NeuroFibrillaire

DPPH : Diphényl picryl-hydrayl

DTNB : 5-5'-dithiobis (acide -2- nitrobenzoïque)

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

EHEAC : Extrait hydroéthanolique d'*Autranella congolensis*

GPx : Glutathion Peroxydase

HMGCR : Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (ou 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA réductase)

LC/MS : Chromatographie en phase liquide – Spectrométrie de masse

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LDL : Lipoprotéines de basse densité, de l'anglais « Low-Density Lipoprotein »

LDLR : Récepteur de lipoprotéines de faible densité (LDL)

LTP : Potentialisation à long terme, de l'anglais « Long Terme Potentiation »

LXR : Récepteur hépatique X, de l'anglais « Liver X Receptor »

MA : Maladie d'Alzheimer

MAPK : Protéine kinase activée par des agents mitogènes, de l'anglais « Mitogen-Activated Protein Kinase »

MCI : Déclin cognitif léger, de l'anglais « Mild Cognitive Impairment »

MDA : Malondialdéhyde

MRCT : Mémoire de reconnaissance à court terme

MRLT : Mémoire de reconnaissance à long terme

NCX : Echangeur sodium calcium, de l'anglais « Sodium Calcium Exchanger »

NMDA : Acide *N*-méthyl-D-aspartique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PHFs : Filaments appariés en hélice, de l'anglais « Paired Helical Filaments »

PKC : Protéine kinase C

PI3K : Phosphatidylinositol kinase de type 3

PMCA : Plasmalemmal Ca²⁺-ATPase de l'anglais « Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase »

PSEN1 : Préséniline 1

PSEN2 : Préséniline 2

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS : Espèces réactives de l'oxygène, de l'anglais « Reactive oxygen species »

SCAP : Protéine activant le clivage de SREBP, de l'anglais « SREBP Cleavage-Activating Protein »

SNC : Système Nerveux Central

SOD : Superoxyde Dismutase

SREBP : Protéine de liaison à l'élément de régulation des stérols, de l'anglais « Sterol
Regulatory Element-Binding Protein »

TEMP : Tomographie d'Emission MonoPhotonique

TEP : Tomographie à Emission de Positrons

Tau : « Tubulin Associated Unit »

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie transversale de l'hippocampe de souris.....	5
Figure 2 : Plaque amyloïde à noyau dense après un immunomarquage utilisant un anticorps anti-A β (Dako).	9
Figure 3 : Séquence des dépôts amyloïdes (Plaques Séniles).....	9
Figure 4 : Métabolisme de l'APP.	10
Figure 5 : Quatre exemples de dégénérescence neurofibrillaire marqués avec l'anticorps TG3	11
Figure 6 : Atrophie cérébral	12
Figure 7 : Principales classes de lipides et sous-types bien connus.....	15
Figure 8 : Représentation du cholestérol en structure plane	15
Figure 9 : Métabolisme, transport et internalisation du cholestérol dans le SNC.....	18
Figure 10 : Espèces réactives de l'oxygène (ROS).	20
Figure 11 : Fonction synchronisée des activités enzymatiques de la SOD, CAT et GPx.....	23
Figure 12 : Formations des aldéhydes réactifs lors de la peroxydation des AGPI.....	25
Figure 13 : Production de ROS par les peptides A β en présence d'ions métalliques.	27
Figure 14 : Synthèse et dégradation de l'acétylcholine	30
Figure 15 : Prévalence mondiale de la maladie d'Alzheimer selon l'âge et le sexe.....	31
Figure 16 : Schéma représentatif du moment le plus approprié (hypothétiquement) pour prévenir la maladie d'Alzheimer.....	34
Figure 17 : Classification des polyphénols.....	37
Figure 18 : Principales classes de l'acide phénolique.....	38
Figure 19 : Structure générale des flavonoïdes.....	39
Figure 20 : Schéma général du métabolisme des polyphénols	40
Figure 21 : Structure moléculaire d'un triterpène pentacyclique le taraxérol	43
Figure 22 : Distribution de <i>Baillonella toxisperma</i> et <i>Autranella congolensis</i>	46
Figure 23 : <i>Autranella congolensis</i> : arbres, feuilles et écorces, fruits et graines	47
Figure 24 : Vue générale du protocole de réalisation de l'OR : phase de familiarisation.....	61
Figure 25 : Capacité antioxydante des extraits	92
Figure 26 : Concentrations de piégeage 50 du radical DPPH \bullet des extraits et de la quercétine.....	92
Figure 27 : Concentrations de piégeage 50 du radical NO des extraits et de la quercétine.	93

Figure 28: Concentrations de piégeage 50 du Fe ²⁺ des extraits et de la quercétine.	93
Figure 29 : Profil chromatographique de l'extrait hydroéthanolique d' <i>A. congolensis</i>	94
Figure 29 a: Spectre de masse du composé A	94
Figure 29 b : Spectre de masse du composé B	95
Figure 29 c : Spectre de masse composé C	95
Figure 29 d : Spectre de masse du composé D	96
Figure 29 e : Spectre de masse du composé E	96
Figure 30 : Effet protecteur de l'EHEAC contre la formation de diènes conjugués dans le cerveau.....	98
Figure 31: Effet protecteur de l'EHEAC contre la génération de MDA dans le cerveau	98
Figure 32: Effet protecteur de l'EHEAC contre l'accumulation des protéines oxydées dans le cerveau	99
Figure 33: Effet protecteur de l'EHEAC contre l'oxydation des thiols protéiques dans le cerveau.....	99
Figure 34: Effet stimulateur de l'EHEAC sur l'activité de la superoxyde dismutase cérébrale	100
Figure 35: Effet stimulateur de l'EHEAC sur l'activité de la catalase cérébrale.....	101
Figure 36 : Effet stimulateur de l'EHEAC sur l'activité de la glutathion peroxydase cérébrale	101
Figure 37 : Effet stimulateur de l'EHEAC sur la capacité antioxydante totale plasmatique	102
Figure 38 : Effet protecteur de l'EHEAC contre l'hémolyse induite par les radicaux libres	102
Figure 39: Effet protecteur de l'EHEAC contre la formation des diènes conjugués dans le plasma.....	103
Figure 40: Effet protecteur de l'EHEAC contre la génération de MDA dans le plasma	104
Figure 41: Effet protecteur de l'EHEAC contre la formation des diènes conjugués dans les érythrocytes.....	104
Figure 42: Effet protecteur de l'EHEAC contre la génération de MDA dans les érythrocytes.....	105
Figure 43: Effet protecteur de l'EHEAC contre l'accumulation des protéines oxydées dans le plasma.....	106
Figure 44: Effet protecteur de l'EHEAC contre l'accumulation des protéines oxydées dans les érythrocytes.....	106
Figure 45: Effet inhibiteur de l'EHEAC sur l'activité de l'acétylcholinestérase cérébrale	107

Figure 46: Effet inhibiteur de l'EHEAC sur l'activité de la butyrylcholinestérase cérébrale des rates	108
Figure 47: Effet de l'EHEAC sur le maintien du rapport BuChE/AChE cérébral.....	108
Figure 48: Effet protecteur de l'EHEAC contre l'accumulation du calcium cérébral....	109
Figure 49: Effet de l'EHEAC sur le maintien du taux de magnésium cérébral	109
Figure 50: Effet de l'EHEAC sur le maintien du rapport calcium/magnésium cérébral	110
Figure 51: Effet stimulateur de l'EHEAC sur l'activité de la Mg ²⁺ -ATPase cérébrale .	111
Figure 52: Effet stimulateur de l'EHEAC sur l'activité de la Ca ²⁺ -ATPase cérébrale ..	111
Figure 53: Effet stimulateur de l'EHEAC sur l'activité de la Na ⁺ , K ⁺ -ATPase cérébrale	112
Figure 54: Effet protecteur de l'EHEAC contre l'accumulation du cholestérol au niveau cérébral	113
Figure 55: Effet protecteur de l'EHEAC sur les phospholipides cérébraux	113
Figure 56: Effet de l'EHEAC sur le maintien du ratio molaire Cholestérol/Phospholipides cérébral	114
Figure 57: Effet protecteur de l'EHEAC sur les plasmalogènes cérébraux.....	114
Figure 58: Effet antihypercholestérolémiant de l'EHEAC	115
Figure 59: Effet antihyperlipidémiant de l'EHEAC	116
Figure 60: Effet protecteur de l'EHEAC sur les plasmalogènes dans le plasma	116
Figure 61: Effet protecteur de l'EHEAC sur les plasmalogènes érythrocytaires	117
Figure 62: Effet stimulateur de l'EHEAC sur l'utilisation du glucose cérébral.....	118
Figure 63: Effet hypoglycémiant de l'EHEAC.....	118
Figure 64: Effet inhibiteur de l'EHEAC sur l'activité de LDH.....	119
Figure 65: Effet inhibiteur de l'EHEAC sur l'activité de l'aconitase cérébrale.....	119
Figure 66 : Microphotographies du gyrus denté (x200) de l'hippocampe après coloration à l'hématoxyline-éosine	121
Figure 67 : Microphotographies de la corne d'Ammon 1 (CA1) (X200) de l'hippocampe après coloration à l'hématoxyline-éosine	122
Figure 68 : Microphotographies de la corne d'Ammon 2 (CA2) (X200) de l'hippocampe après coloration à l'hématoxyline-éosine	123
Figure 69 : Microphotographies de la corne d'Ammon 3 (CA3) (X200) de l'hippocampe après coloration à l'hématoxyline-éosine	124
Figure 70: Microphotographies des cornes d'Ammon 1 (X200) de l'hippocampe ; Coloration au Crésyl violet.....	125
Figure 71: Microphotographies des cornes d'Ammon 3 (X200) de l'hippocampe ; Coloration au Crésyl violet.....	126

Figure 72: Préservation de la mémoire à court terme par l'EHEAC (semaine 4).....	128
Figure 73: Présevation de la mémoire à court terme par l'EHEAC (semaine 7)	128
Figure 74: Comparaison des indices de reconnaissance en % contrôle des semaines 4 et 7 dans chaque groupe (mémoire à court terme)	129
Figure 75: Préservation de la mémoire de reconnaissance à long terme par l'EHEAC (semaine 4).....	129
Figure 76: Préservation de la mémoire de reconnaissance à long terme par l'EHEAC (semaine 7).....	130
Figure 77: Comparaison des indices de reconnaissance en % contrôle des semaines 4 et 7 dans chaque groupe (mémoire à long terme)	130
Figure 78: Préservation de l'apprentissage par l'EHEAC (semaine 5).....	131
Figure 79: Préservation de la mémoire spatiale par l'EHEAC (Semaine 5).....	131
Figure 80: Préservation de l'apprentissage par l'EHEAC (semaine 8).....	132
Figure 81: Préservation de la mémoire spatiale par l'EHEAC (semaine 8)	133
Figure 82: Préservation de la coordination motrice par l'EHEAC (semaine 4).....	134
Figure 83: Préservation de la coordination motrice par l'EHEAC (semaine 7).....	134
Figure 84: Comparaison des temps de latence en % contrôle des semaines 4 et 7 dans chaque groupe (coordination motrice)	135

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : quelques composés phénoliques isolés des espèces de sapotacées	44
Tableau II : Composition en molécules bioactives de l'huile d'argan	45
Tableau III : Travaux antérieurs sur les écorces d' <i>Autranella congolensis</i>	48
Tableau IV : Composition de la diète	49
Tableau V : Répartition des animaux et traitements	59
Tableau VI : Préparation des tubes pour l'étalonnage de l'activité de la catalase	70
Tableau VII : Préparation des tubes pour l'étalonnage de la GPx.....	71
Tableau VIII : Préparation des tubes pour le dosage de l'activité des ATPases	76
Tableau IX : Préparation des tubes pour l'étalonnage de l'activité des transaminases	84
Tableau X : Préparation des tubes pour l'étalonnage des protéines totales	86
Tableau XI : Teneurs en composés bioactifs des extraits d' <i>A. congolensis</i>	91
Tableau XII : Composés identifiés par HPLC/MS dans l'extrait hydroéthanolique d' <i>Autranella congolensis</i>	97

RESUME

L'incidence de la maladie d'Alzheimer (MA), l'une des principales maladies associées au vieillissement caractérisée par la détérioration progressive de la mémoire est en augmentation. Il est suggéré que les polyphénols peuvent moduler les fonctions cérébrales et permettre de prévenir le déclin cognitif lié à l'âge ou à la MA. L'objectif de cette thèse était d'évaluer les effets modulateurs d'*Austranella congolensis*, sur quelques modifications biochimiques, neuropathologiques et cognitives impliquées dans le développement de la MA. Dans un premier temps, nous avons préparé trois extraits (aqueux, éthanolique et hydroéthanolique) d'écorces de la plante et déterminé leurs teneurs en polyphénols, flavonoïdes. Ensuite, nous avons évalué le potentiel antioxydant de ces extraits et caractériser par HPLC /SM le meilleur extrait. Dans un second temps, nous avons évalué sur un modèle animal de neurotoxicité induit par l' AlCl_3 les activités biologiques du meilleur extrait sur des paramètres impliqués dans le développement de la MA (stress oxydant, dysfonctionnement métabolique cérébral, neurodégénérescence, déclin cognitif). Les résultats ont montré que l'extrait hydroéthanolique (EHEAC) présentait les meilleures teneurs en polyphénols ($28,77 \pm 2,39$ mgEAG/g MS) et flavonoïdes ($14,93 \pm 0,133$ mgEQ /g MS) et le meilleur potentiel antioxydant *in vitro*. La caractérisation a révélé la présence de la catéchine, l'acide férulique et le taraxérol connus comme étant neuromodulateurs ou neuroprotecteurs. Ces composés ont été précédemment isolés de la plante. *In vivo*, l'EHEAC (150 mg/kg PC) a significativement ($p < 0,05$) empêché la formation de diènes conjugués, la production de MDA et l'accumulation des protéines oxydées induit par l' AlCl_3 mieux que la vitamine E. Cet effet résultait d'une augmentation de l'activité cérébrale des enzymes antioxydantes (catalase, glutathion peroxydase). L'EHEAC empêchait également l'hyperactivité des cholinestérases, prévenait l'accumulation du cholestérol cérébral tout en augmentant les niveaux de glycérophospholipides, favorisait l'utilisation du glucose cérébral en augmentant la glycolyse et le cycle de krebs et favorisait l'homéostasie du calcium en augmentant l'activité enzymatique des pompes ioniques. L'EHEAC préservait également l'architecture neuronale des couches de l'hippocampe. La co-administration de l'EHEAC permettait une amélioration et une conservation des performances mnésiques des animaux. L'ensemble des résultats suggère que l'EHEAC pourrait avoir de l'intérêt pour prévenir ou tout au moins ralentir la progression de la MA.

Mots clés : Maladie d'Alzheimer ; Extrait hydroéthanolique d'*Austranella congolensis*, Chlorure d'aluminium, Déclin cognitif, *In vivo*, Rat.

ABSTRACT

Due to progressive population aging, the incidence of aging-related diseases, especially Alzheimer's disease characterized by progressive cognitive decline is increasing. There has been emerging evidence on the link of certain dietary components, particularly polyphenols, to brain wellness and cognitive outcomes. The objective of this thesis was to evaluate the modulative effects of *Austranella congolensis*, on biochemical, neuropathological and cognitive alterations implicated in AD development. Firstly, three extracts were prepared (aqueous, ethanolic and hydroethanolic) from bark of *A. congolensis* and their total phenolics, flavonoids contents were determined by colorimetric tests. The antioxidant potential of these plant extracts was also evaluated. We further characterized the best extract using liquid chromatographic coupled with mass spectrometry techniques (HPLC/MS). Secondly, we evaluated biological activities of best extract on parameters involved in the development of the AD (oxidative stress, brain metabolic dysfunction, neurodegeneration, cognitive decline). In order to accomplish these, the $AlCl_3$ rats model that develops pathologic processes close to what is observed in AD was used. The hydroethanolic extract (HEEAC) showed more polyphenols (28.77 ± 2.39 mgEAG/g DM) and flavonoids (14.93 ± 0.133 mgEQ /g DM). This extract also showed the best *in vitro* antioxidant activity and was therefore used for the rest of the study. We identified three compounds in this extract: catechin, ferulic acid and taraxerol (known as neuroprotector and neuromodulator). All those compounds were previously isolated from this plant. *In vivo*, HEEAC (150 mg/kg) significantly ($p < 0,05$) prevents the formation of conjugated diene, generation of MDA and accumulation of oxidized proteins induced by $AlCl_3$ better than vitamin E. This effect was the result of modulation of brain antioxidant enzyme activities (catalase and glutathione peroxidase). HEEAC also prevents the hyperactivity of brain cholinesterase, lowering brain cholesterol, improve brain glucose utilization by increasing glycolysis and Krebs cycle and improve calcium homeostasis by increasing the enzymatic activities of ion pumps. Furthermore, the HEEAC co-administration resulted in preservation of neuronal morphology of hippocampus layers and in conservation of memory abilities. Taken together, these results show that HEAAC could be a relevant therapeutic agent to prevent or at least slow down the evolution of the pathology in Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's disease, Hydroethanolic extract of *Austranella congolensis*, Aluminum chloride, Cognitive decline, *In vivo*, Rat.

INTRODUCTION

L'un des phénomènes marquants de ce XXI^e siècle est le vieillissement de la population, c'est-à-dire l'allongement de la durée de vie et en conséquence, l'augmentation considérable du nombre et de la proportion de personnes âgées. Avec ce vieillissement accéléré, la maladie d'Alzheimer (MA) comme les autres types de démence, ainsi que toutes les pathologies chroniques liées au vieillissement sont devenues un problème majeur de santé publique (Prince *et al.*, 2016 ; Lane *et al.*, 2018).

La MA se caractérise par une détérioration des fonctions cognitives touchant principalement la mémoire. Au niveau clinique, une perte à la fois neuronale et synaptique, associée à la formation de plaques amyloïdes extracellulaires constituées de peptide beta-amyloïde (A β) mais aussi à des dépôts intracellulaires de protéine tau (*tubule associated unit*) formant des enchevêtrements neurofibrillaires (Galvin *et al.*, 2012). Les personnes atteintes par la MA présentent également des dépôts de gras dans le cerveau. Ces accumulations de gras pourraient constituer un déclencheur de la maladie (Hamilton *et al.*, 2015). En effet, le Dr Alois Alzheimer lui-même avait déjà noté la présence des dépôts de lipides dans le cerveau des patients après leur mort, lorsqu'il a décrit la maladie pour la première fois en 1906. En effet, il a été montré que ces acides gras sont produits par le cerveau, qu'ils s'accumulent lentement avec le vieillissement normal, mais que le processus est fortement accéléré en présence des gènes prédisposant à la MA (Hamilton *et al.*, 2015). L'accumulation de ces acides gras ne serait pas une conséquence mais bien une cause ou un facteur accélérant de la maladie. Cette découverte soutient ainsi la thèse à l'effet que la MA serait une maladie métabolique du cerveau, un peu comme l'obésité ou le diabète sont des maladies métaboliques périphériques (de la Monte et Tong, 2014). Par ailleurs, une diminution du métabolisme du glucose, avant l'apparition des symptômes, de la MA, suggère qu'elle puisse prendre une part prépondérante dans sa genèse, en participant à la perturbation de la communication neuronale (Abolhassani *et al.* 2017). De nombreux autres dysfonctionnements cellulaires ont été mis en évidence dans le développement de la MA. Ainsi, la libération des neurotransmetteurs pré-synaptiques, tels que l'acétylcholine, et les courants ioniques induits par les récepteurs post-synaptiques sont altérés (Querfurth et LaFerla, 2010). Un dysfonctionnement mitochondrial et une perturbation de l'homéostasie ionique à l'origine d'un stress oxydatif majeur ont été également observés (Huang *et al.*, 2016 ; Tönnies et Trushina, 2017).

Des études ont également montré une corrélation entre l'ingestion d'aluminium présent dans l'eau et une diminution des facultés cognitives (Rondeau *et al.*, 2001) ; il semblerait que l'aluminium, tout comme d'autres ions métalliques tels que le fer, favorisent l'apparition des

lésions caractéristiques de la maladie (Banksa *et al.*, 2006).

L'aspect évolutif des mécanismes pathogènes mis en jeu dans le développement des maladies liées au vieillissement incite donc largement à considérer l'intérêt d'interventions préventives dès le milieu de vie, permettant d'envisager la montée en âge vers un vieillissement normal ou réussi, minimisant ainsi les risques de développer ces diverses maladies ou au moins ralentissant les processus délétères afin d'en retarder la survenue (Viña et Sanz-Ros, 2018). Développer de telles approches préventives est d'autant plus important pour la MA qu'aucune mesure thérapeutique n'a encore été développée permettant de la soigner efficacement, ni même d'en empêcher son évolution (Cummings *et al.*, 2017). Dans ce contexte, les méthodes nutritionnelles apparaissent comme une stratégie réaliste capable de préserver les capacités cognitives, limiter le vieillissement cérébral et enrayer l'augmentation automatique de la prévalence de la maladie avec la croissance des populations des 3^e et 4^e âges (Dufлот, 2018).

Les connaissances acquises au cours des dernières années grâce aux études épidémiologiques, précliniques et cliniques ont permis de révéler l'importance de l'apport alimentaire en polyphénols et d'autres métabolites secondaires pour la physiologie du système nerveux et les fonctions cognitives (Williams et Spencer, 2012 ; Rajaram *et al.*, 2019 ; Yang *et al.*, 2021). À ce titre, la littérature scientifique a très largement identifié ces composés comme des molécules globalement protectrices et biodisponibles pouvant faire d'eux les éléments clés de stratégies préventives vis-à-vis du développement de différentes pathologies, et particulièrement la MA (Wahl *et al.*, 2017). Ces composés neuroprotecteurs ou neuromodulateurs sont abondamment retrouvés dans les plantes de la famille des sapotacées y compris *Argania spinosa* (Badreddine *et al.*, 2017). Cette plante endémique au Maroc suscite aujourd'hui beaucoup d'intérêts notamment dans la fonction neurologique et dans certaines maladies liées à l'âge (Badreddine *et al.*, 2017). *Autranella congolensis* encore appelée « elang Adjap » en langue Ewondo (Cameroun) est une plante de cette famille également riche en polyphénols et triterpènes pentacycliques (Fokou, 2006). Cette plante endémique des régions du bassin du Congo est utilisée pour ses nombreuses propriétés biologiques y compris cardiotoniques. Aucune étude sur les effets protecteurs contre les maladies neurodégénératives n'a été réalisée sur cette plante. D'où le présent travail dont les hypothèses étaient les suivantes :

HYPOTHESES

1. Le meilleur extrait antioxydant d'*Autranella congolensis* contient des composés bioactifs et est actif contre le stress oxydatif;
2. *Autranella congolensis* est susceptible de moduler les systèmes de transmission cholinergiques, l'homéostasie du calcium et le métabolisme du cholestérol et du glucose cérébral;
3. *Autranella congolensis* permet de préserver les couches neuronales de l'hippocampe et favoriser une régulation ou une conservation des capacités de mémorisation.

OBJECTIF GENERAL

Evaluer les effets modulateurs d'*A. congolensis* sur quelques altérations biochimiques, neuropathologiques et cognitives associées à maladie d'Alzheimer.

OBJECTIFS SPECIFIQUES

- 1- Déterminer le meilleur extrait antioxydant des écorces d'*A. congolensis*, sa composition phytochimique et son effet sur le stress oxydatif ;
- 2- Déterminer les effets du meilleur extrait sur les déficits cholinergiques, la perte de l'homéostasie du calcium, l'accumulation du cholestérol cérébral et l'altération du métabolisme du glucose ;
- 3- Déterminer l'effet de cet extrait sur les modifications structurales de l'hippocampe et sur les performances amnésiques des rats.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITERATURE

I.1. Le vieillissement cérébral

I.1.1. Le vieillissement

La complexité et la multitude de facteurs qui interviennent dans les processus de vieillissement rendent sa définition difficile. De nombreuses théories ont émergé depuis les années 1960, jusqu'à celle de John Rowe et Robert Kahn qui proposent en 1987 qu'un vieillissement « réussi » réunit les trois éléments suivants ; l'absence de maladie, le maintien d'une bonne condition physique et cognitive et une implication active dans la vie courante (Cosco *et al.*, 2017). Cependant, la frontière entre le vieillissement sain et le vieillissement pathologique est ténue et constitue plutôt un continuum. En effet, le vieillissement par essence augmente le risque de développer diverses maladies, notamment les maladies neurodégénératives (Hou *et al.*, 2019). De Winter va même jusqu'à considérer que le vieillissement est une maladie en soi, en définissant celle-ci comme un état dans lequel l'organisme rencontre des limitations de ses capacités et de son fonctionnement par rapport à la normale (De Winter, 2015). Toutefois, le vieillissement peut se définir comme l'ensemble des modifications physiologiques que connaît l'organisme tout au long de sa vie, conduisant au déclin lent et progressif de toutes les fonctions et aboutissant à la mort. Bien que complexe, la définition du vieillissement à l'échelle cellulaire fait intervenir un processus nommé sénescence répllicative. Le terme « sénescence » réfère à l'arrêt définitif de la prolifération de cellules âgées et/ou endommagées (McHugh et Gil, 2018).

I.1.2. Le déclin cognitif lié à l'âge

I.1.2.1. Les fonctions cognitives affectées

I.1.2.1.1. L'hippocampe structure cérébrale impliquée dans la mémoire

Le lobe temporal joue de très nombreux rôles dans les fonctions cognitives, telles que l'audition, le langage, la perception visuelle, et la mémoire. Il présente de plus un rôle central dans l'apparition et le décours temporel de la maladie d'Alzheimer. Dans ce dernier se retrouve l'hippocampe (Figure 1). L'hippocampe est divisé en quatre régions distinctes : les trois cornes d'Ammon (CA1-2-3) et le gyrus denté (DG). De plus, il est possible de distinguer cinq couches dans la région CA1, soit l'*alveus*, les *stratum oriens*, *pyramidale*, *radiatum* et *lacunosum-moleculare* (Anderson *et al.*, 2006).

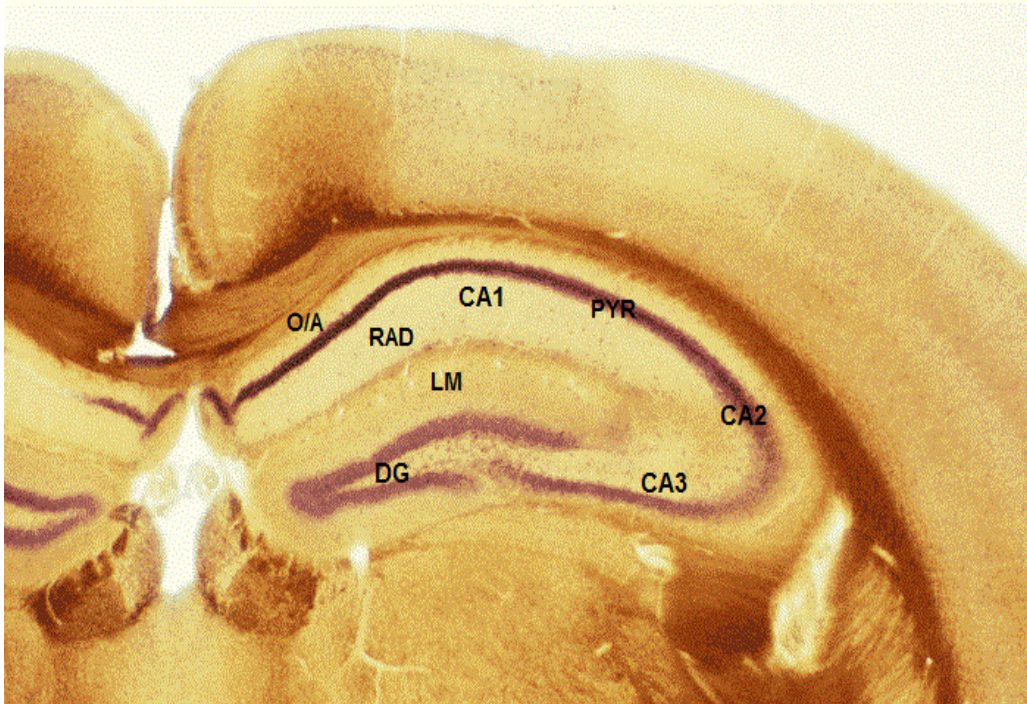


Figure 1 : Anatomie transversale de l'hippocampe de souris (Gervais, 2019).

O/A : stratum oriens/alveus; PYR : stratum pyramidale; RAD : stratum radiatum ; LM : stratum lacunosum moleculare; DG : gyrus denté; CA1-CA2-CA3 : subdivisions de la corne .

Dans l'hippocampe, deux principaux neurotransmetteurs ont un rôle essentiel: l'acétylcholine (ACh) et le glutamate. L'ACh est un neurotransmetteur impliqué dans les processus d'apprentissage et de mémoire, c'est le seul qui n'est pas fabriqué à partir d'un acide aminé (AA). Il provient de la choline et de la forme active de la vitamine B5 (ou acide pantothénique) présents dans l'alimentation. Son rôle est de déclencher la contraction musculaire et de stimuler l'excrétion d'hormones. Au niveau de la mémoire, un taux élevé d'ACh facilite l'étape d'encodage des informations tandis qu'un faible taux permet la consolidation de nouveaux souvenirs (Micheau et Marighetto, 2011).

I.1.2.1.2. Le déclin cognitif

Les effets du vieillissement sur le cerveau renvoient inévitablement au déclin lié à l'âge des fonctions cognitives. Les principales fonctions cognitives comprennent la mémoire, les capacités d'attention, le langage ou encore les fonctions exécutives telles que le raisonnement ou la planification (Harada *et al.*, 2013). Non seulement ces fonctions ne sont pas toutes affectées au même rythme, mais l'âge d'apparition des premiers déficits varie d'une personne à l'autre (Carmona et Michan, 2016), ce qui introduit une importante variabilité interindividuelle et empêche de fixer de façon univoque l'âge de début du déclin cognitif lié à

l'âge (Salthouse, 2009). L'alimentation, le stress ou l'activité physique sont des facteurs qui ont une incidence sur la vitesse du déclin cognitif notamment au niveau de l'hippocampe (Jaroudi *et al.*, 2017).

I.1.2.2. Les modifications morphologiques cérébrales et altération de la mémoire

I.1.2.2.1. Les modifications morphologiques

Au cours du vieillissement, le volume du cerveau diminue mais contrairement à une idée préconçue, cette réduction de volume n'est pas associée à une mort neuronale significative (Lupo *et al.*, 2019). En revanche, le vieillissement cérébral met en cause une importante altération de la morphologie des neurones et de leurs réseaux. Une diminution du nombre, de la densité et de la longueur des épines dendritiques ainsi que le volume des dendrites a été décrite chez l'Homme, le singe, la souris et le rat (Coskren *et al.*, 2015). De plus, il semblerait que ce sont les axones des neurones sénescents qui dégèrent, et non leur corps cellulaire, contribuant à diminuer le volume cérébral. Les structures cérébrales qui subissent une réduction notable au cours du vieillissement comprennent certaines zones du cortex et l'hippocampe (Fjell *et al.*, 2014). La diminution de volume de l'hippocampe se produit à l'approche de la soixantaine d'années et se poursuit à mesure que l'âge progresse à raison de 0,8 à 2% de perte par an (Fjell *et al.*, 2014). Ces perturbations morphologiques s'accompagnent d'altérations fonctionnelles. L'excitabilité intrinsèque des neurones de l'hippocampe, c'est-à-dire la propension à générer un potentiel d'action en réponse à des stimuli excitateurs, est modifiée par l'âge chez les rongeurs (Dunn et Kaczorowski, 2019). L'âge induit également un remaniement de la configuration post-synaptique, avec une baisse de la présence des récepteurs du glutamate (NMDA, AMPA), un affaiblissement de l'expression des protéines de densité post-synaptique (PSD-95, synaptophysine, certaines protéines de la famille SNARE), ce qui affecte l'efficacité de transmission synaptique (Fan *et al.*, 2017). Par ailleurs, une réduction de la quantité de cellules prolifératives dans le gyrus denté, ainsi que des modifications liées à l'âge de la signalisation dans les niches neurogéniques, seraient également à l'origine d'un effondrement de la neurogenèse hippocampique adulte (Fan *et al.*, 2017).

I.1.2.2.2. Altération des mémoires

Toute cette déstabilisation du fonctionnement de l'hippocampe vieillissant se répercute irrémédiablement sur les mémoires qui en dépendent. Notamment, la mémoire spatiale et la mémoire épisodique dépendent toutes deux de l'hippocampe (Moser *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2017). La mémoire spatiale fait référence à la capacité à former et retenir une représentation

spatiale mentale. Elle repose notamment sur la symétrie entre les déplacements successifs de l'individu dans l'espace et l'activation séquentielle de neurones de l'hippocampe appelés « cellules de lieu » (Moser *et al.*, 2015; Lester *et al.*, 2017). Autrement dit, la séquence d'activation de ces cellules dans l'hippocampe suit le déplacement physique de l'individu dans l'espace. Ces cellules de lieu sont présentes chez un grand nombre de mammifères, dont l'Homme et la souris, et coopèrent avec d'autres types de neurones dans le but d'intégrer les informations nécessaires à la formation d'une carte mentale et faciliter la navigation spatiale (Lester *et al.*, 2017). La préservation de cette mémoire est fondamentale pour le maintien de l'indépendance des sujets. La mémoire épisodique correspond schématiquement à la mémoire de l'expérience personnelle, des souvenirs autobiographiques et retient les informations correspondant aux « où », « quoi » et « quand » (Harada *et al.*, 2013). Ces deux types de mémoire sont altérées au cours du vieillissement normal (Lester *et al.*, 2017).

I.1.3. Le déclin cognitif léger (MCI) : un état précurseur de la MA

Le déclin cognitif léger ou MCI, défini comme intermédiaire entre le déclin cognitif normal et pathologique, est une période charnière pour le basculement dans la démence, ou l'éventuel retour à une cognition normale. De nombreux facteurs liés à l'hygiène de vie ou à la santé générale des sujets influencent la vitesse de progression de cet état pré-dément à la démence (Campbell *et al.*, 2013; Jongsiriyanyong et Limpawattana, 2018). Des sous-types de MCI ont été définis dans le but de mieux caractériser le risque de développer une démence d'une part, et quel type de démence d'autre part (Campbell *et al.*, 2013). En effet, le statut MCI conduit préférentiellement au développement de la MA, mais peut aussi déboucher sur d'autres types de démences (Campbell *et al.*, 2013; Vega et Newhouse, 2014). Plusieurs définitions des sous-types de MCI ont été proposées sur la base de l'observation de biomarqueurs et du type de fonction cognitive altérée (Vega et Newhouse, 2014), mais toutes s'accordent sur la cooccurrence des éléments suivants pour définir le statut MCI : (i) une plainte cognitive subjective ; (ii) au moins une fonction cognitive altérée objectivement ; (iii) le déroulement normal des activités de la vie quotidienne, en toute autonomie, (iv) l'absence de démence (Vega et Newhouse, 2014; Petersen, 2016). L'atteinte de la mémoire du sujet MCI plutôt qu'une autre fonction cognitive, fait de lui un MCI dit amnésique, et est très fortement liée au risque de développer la MA (Petersen, 2016).

I.2. La maladie d'Alzheimer

I.2.1. Diagnostiquer la maladie d'Alzheimer

La MA est la cause de démence la plus répandue dans le monde ; parmi 47 millions de personnes atteintes de démence, 24 millions sont des cas d'Alzheimer (Winblad *et al.*, 2016; Knopman *et al.*, 2018). Au vu de l'espérance de vie qui s'allonge continuellement (GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators, 2016), la MA pourrait affecter 100 millions de personnes d'ici 2050 (Skaper, 2012). Cette maladie neurodégénérative se manifeste par des atteintes prédominantes de la mémoire, des troubles de l'humeur, une altération des fonctions exécutives ainsi qu'une désorientation importante (Tromp *et al.*, 2015; Hou *et al.*, 2019). L'ensemble de ces perturbations, qui apparaissent progressivement, conduit inexorablement à la perte d'autonomie des patients. Le coût lié au diagnostic et à la prise en charge des patients est considérable (Winblad *et al.*, 2016). Le diagnostic irréfutable et définitif de la MA ne peut se faire que *post-mortem*, avec l'observation dans le cerveau des lésions histologiques caractéristiques : les plaques amyloïdes (pathologie amyloïde) et les enchevêtrements neurofibrillaires (pathologie tau) (Tremblay *et al.*, 2017). Toutefois, un diagnostic clinique « probable » peut être posé du vivant du malade par des tests cognitifs (Webster *et al.*, 2014).

I.2.2. Neuropathologie caractéristique de la maladie d'Alzheimer

I.2.2.1. Les lésions histologiques

L'étude histologique post-mortem du cerveau des patients atteints de MA révèle l'existence deux grands types de lésions : les plaques séniles (PS), les dégénérescences neurofibrillaires (DNF)

➤ Les plaques séniles

▪ Description

Lorsqu'en 1907 Aloïs Alzheimer décrit la présence de plaques de substance anormale dans le cerveau de son patient, il observe en réalité des agrégats extracellulaires composés en majorité d'une protéine appelée peptide A β , qui forme de longues fibrilles insolubles. Ces plaques séniles (Figure 2), qui sont aujourd'hui reconnues comme des lésions caractéristiques de la MA, contiennent également d'autres molécules : de l'apolipoprotéine E (Namba *et al.*, 1991), du fer (Collingwood *et al.*, 2008) et des composantes de la matrice extracellulaire (Verbeek *et al.*, 2002). Ces lésions s'étendent séquentiellement du néocortex jusqu'à l'ensemble du cerveau (Figure 3).

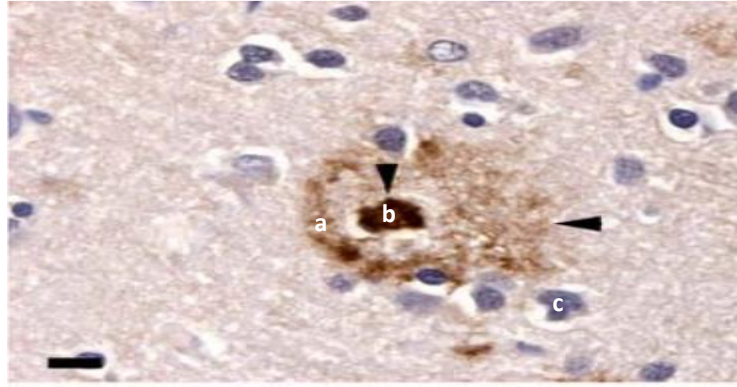


Figure 2: Plaque amyloïde à noyau dense après un immunomarquage utilisant un anticorps anti-A β (Dako) (Delatour et al., 2009).

Le dépôt focal est entouré d'une couronne légèrement marquée de peptides A β (têtes de flèche). Echelle : 10 μ m. a : dépôt focal amyloïde, b : cœur amyloïde, c : noyaux cellules gliales

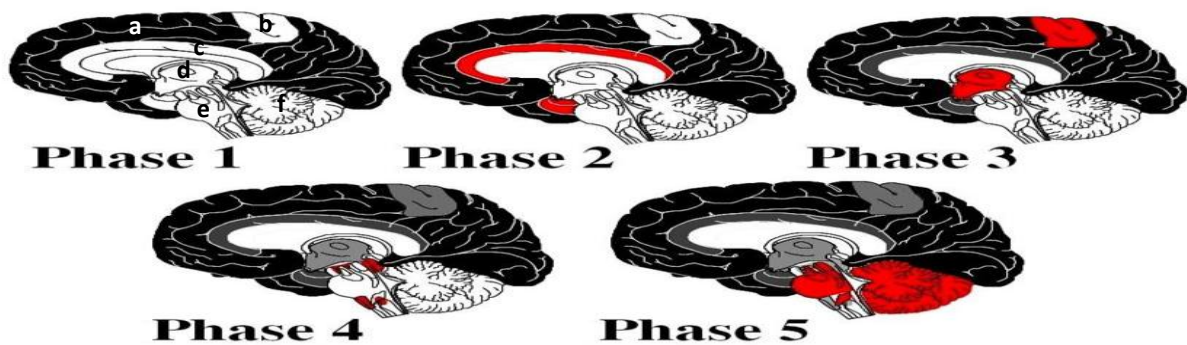


Figure 3: Séquence des dépôts amyloïdes (Plaques Séniles) (Thal et al., 2002).

Les dépôts de peptides A β s'étendent aux différentes structures du cerveau en suivant une séquence spécifique. A la phase 1, ils sont confinés au néocortex (noir). La phase 2 correspond à une atteinte supplémentaire de toutes les régions allocorticales (rouge). A la troisième phase, le cortex et le striatum sont également atteints. Les noyaux du tronc cérébral sont atteints en phase 4. Le cervelet est touché en dernier (phase 5) avec le reste des structures du cerveau. a : néocortex, b : cortex, c : régions allocorticales, d : striatum, e : tronc cérébral, f : cervelet.

▪ Le peptide A β

Le peptide A β est issu de la protéolyse de l'APP (Protéine précurseur du peptide amyloïde β). L'APP est une protéine transmembranaire de 695 à 770 acides aminés. Elle peut être métabolisée selon deux voies (Figure 4) : la voie non amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique.

En condition physiologique, la voie non amyloïdogénique est majoritaire. Dans cette voie, l'APP est clivée en premier par une α -sécrétase. Les α -sécrétases appartiennent à la famille des métalloprotéases à domaine désintégrine (ADAM). Trois de ces ADAM au moins auraient une activité α -sécrétase : ADAM9, ADAM10 et ADAM17. Le clivage de l'APP par l' α -sécrétase se produit dans le domaine correspondant à celui du peptide A β . Ainsi, cette voie prévient la production de ce peptide. Deux peptides sont produits par cette protéolyse : le peptide sAPP α , fragment le plus long et extracellulaire, et le peptide C83, correspondant au fragment C terminal de l'APP. Les fonctions connues du fragment sAPP α incluent des effets neuroprotecteurs, neurotrophiques et de maintien des processus sous-tendant la mémoire (Lopez Sanchez *et al.*, 2019). Le peptide C83 peut subir à son tour un clivage par le complexe γ -sécrétase libérant ainsi un fragment extracellulaire non toxique, p3, et le domaine amyloïde intracellulaire (AICD). Le complexe γ -sécrétase est formé de la préséniline 1 ou 2, de la nicastrine, du pharynx antérieur défectueux 1 (APH-1) et de l'activateur de la préséniline (PEN2).

La voie amyloïdogénique est majoritaire en condition pathologique comme dans la MA (Coronel *et al.*, 2019). Dans cette voie, l'APP est clivée en premier par la β -sécrétase également appelée BACE1. Deux peptides sont produits par cette protéolyse : le peptide sAPP β , fragment extracellulaire, et le fragment C terminal β de l'APP (β -CTF), également appelé peptide C99. Le β -CTF est clivé à son tour par la γ -sécrétase libérant ainsi le peptide A β et l'AICD. Le complexe γ -sécrétase est capable de cliver le β -CTF à plusieurs endroits, expliquant la production de peptides A β de longueurs différentes. Le peptide A β 40 est produit de façon majoritaire et en quantité dix fois supérieure à celle du peptide A β 42 (LaFerla *et al.*, 2007).

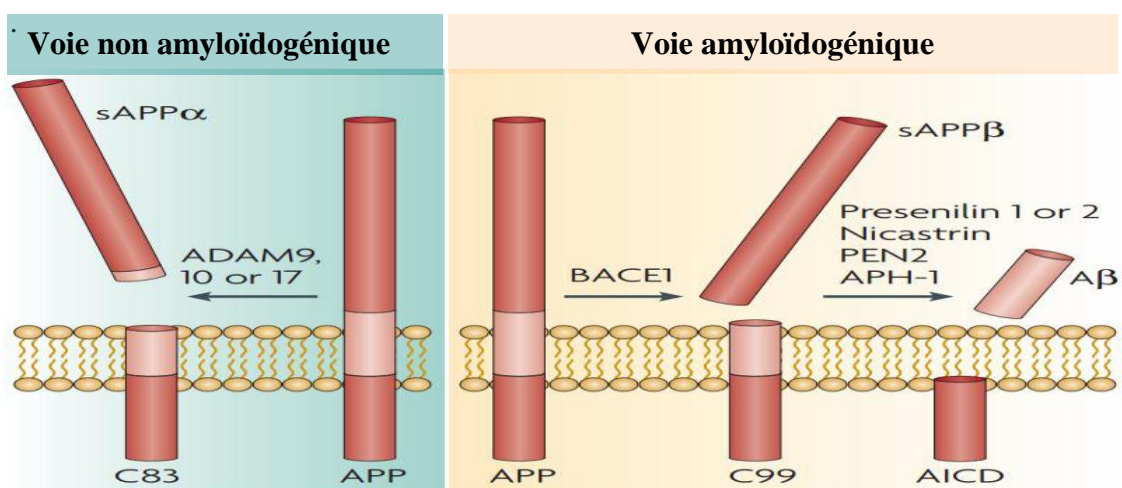


Figure 4: Métabolisme de l'APP (Laferla *et al.*, 2007).

➤ Les dégénérescences neurofibrillaires

▪ Description

Les faisceaux neurofibrillaires décrits en 1907 par Alois Alzheimer ont largement été confirmés comme étant des lésions histologiques typiques de la MA, au même titre que les PS. Ces faisceaux sont aujourd'hui appelés des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) (Figure 5).

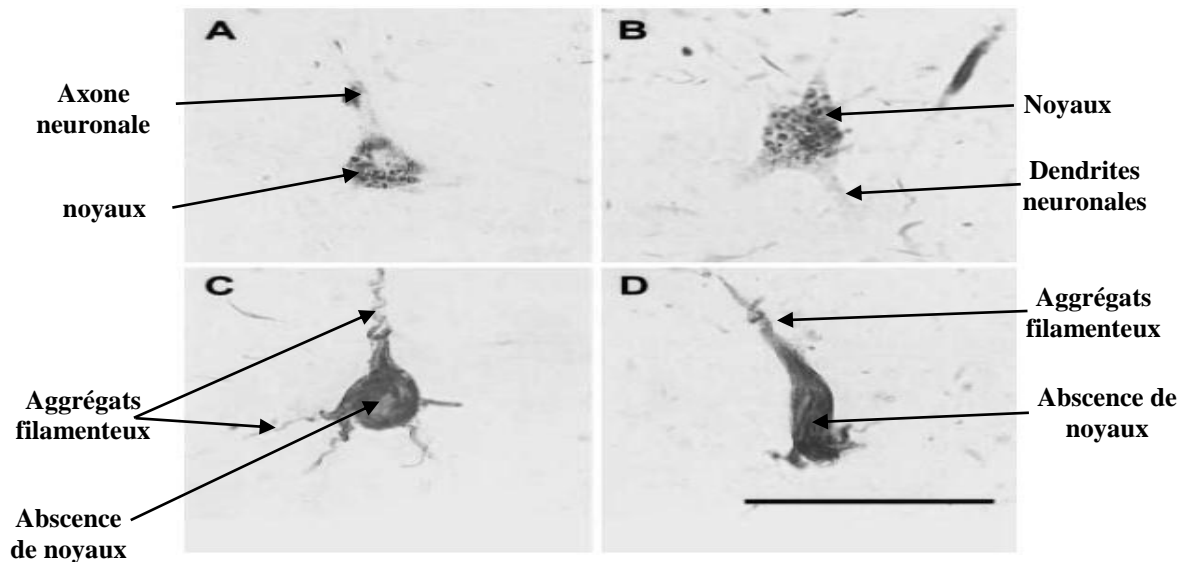


Figure 5 : Quatre exemples de dégénérescence neurofibrillaire observées dans le cortex enthorinal marqués avec l'anticorps phospho-tau (TG3) (Augustinack *et al.*, 2002).

A et B : « Pré dégénérescence » ; *C* : « Intra dégénérescence » ; *D* : « Extra dégénérescence ». Echelle : 50 μ m

L'apparition des neurofibrilles suit une séquence spatio-temporelle caractéristique (Duyckaerts *et al.*, 1998) qui présente une corrélation avec la progression clinique de la maladie. Au niveau cellulaire, ces lésions sont retrouvées dans le cytoplasme des neurones sous forme de dépôts filamenteux. Elles sont constituées de paires de filaments appariés en hélice (PHF pour « paired helical filaments »), dont le constituant principal est la protéine TAU.

▪ La protéine TAU

La protéine TAU (« tubulin associated unit ») appartient à la famille des MAP (« microtubule-associated protein »). Dans les neurones, cette protéine est exprimée au niveau des axones et joue un rôle dans la polymérisation des microtubules (Buée *et al.*, 2000). Ainsi, les processus dynamiques de phosphorylation /déphosphorylation de tau, qui déstabilisent / stabilisent les microtubules des neurones, permettent une bonne fonction synaptique, notamment en facilitant la libération de produits synaptiques (Regan *et al.*, 2017). Dans la MA, la bonne balance phosphorylation/déphosphorylation de TAU semble dérégulée, conduisant à

une sur-phosphorylation de l'ensemble des isoformes de TAU (Buée et Delacourte, 2006). A l'état physiologique et normalement phosphorylé, TAU est une protéine hautement soluble. Cependant, lorsque cette protéine est hyperphosphorylée, elle peut s'organiser en neurofibrilles qui sont à l'origine des DNFs. Ces neurofibrilles ont dans un premier temps été considérées comme étant la cause principale de la neurotoxicité de TAU (Iqbal et *al.*, 2000). Depuis, plusieurs études ont cependant montré que, bien que nocives, elles ne représentent pas la forme la plus toxique de la protéine (Polydoro et *al.*, 2014).

I.2.2.2. L'atrophie cérébrale

➤ Aspect anatomique

L'accumulation progressive des oligomères d'A β et des agrégats de protéine tau phosphorylée induisent une perte neuronale et synaptique significative qui altère les transmissions cholinergique, sérotoninergique, noradrénergique et dopaminergique (Hou *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2019). L'aspect macroscopique des cerveaux de patients souffrant de MA peut être relativement variable, de presque normal à sévèrement atrophié. En général, les patients qui présentent des symptômes cliniques de la maladie évidents ont généralement une atrophie du cerveau bien visible. Le cerveau affiche alors un élargissement de ses sillons et ventricules et un rétrécissement de ses circonvolutions (Figure 6). Cette atrophie corticale peut être visible en imagerie bien avant la mort du patient.



Figure 6: Atrophie cérébrale (Ellison, 1998)

Cette image montre une coupe d'un hémisphère de patient sain (à gauche) et celle d'un hémisphère de patient souffrant de la MA (à droite). L'hippocampe est atrophié chez le patient atteint de MA (flèche), de même que les sillons sont élargis (on peut comparer les deux sillons latéraux délimitant les lobes temporaux des lobes frontaux et pariétaux) et les circonvolutions cérébrales rétrécies.

➤ **Altérations métaboliques**

La tomographie par émission (TE) est une technique qui permet de mesurer les paramètres variant avec l'activité neuronale. Les deux principales techniques de TE qui sont actuellement utilisées sont la tomographie par émission de simples photons (TEMP) et la tomographie par émission de positons au 18-fluorodésoxyglucose (TEP-FDG). Elles permettent respectivement d'étudier le débit sanguin cérébral et le métabolisme cérébral du glucose. Ces techniques ont permis de mettre en évidence un hypométabolisme du cortex cingulaire postérieur et du cortex temporo-pariétal à des stades légers, puis du cortex frontal aux stades plus avancés de la MA (Mosconi, 2005). En effet, les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA) souffrent d'altérations métaboliques et synaptiques précoces. Via la glycolyse et le cycle de Krebs, le métabolisme du glucose permet la production d'ATP, essentielle à l'activité et la plasticité synaptique. En effet, ne représentant que 2% du poids total du corps humain, le cerveau consomme 20% des ressources en oxygène et glucose. Soixante pourcent (60%) de l'énergie consommée par le cerveau est utilisée pour la transmission synaptique et la restauration des gradients ioniques (Abolhassani *et al.* 2017). Aux stades précoces de la maladie, cette atteinte métabolique contraste donc avec l'atteinte atrophique de l'hippocampe et du gyrus parahippocampique. Ceci pourrait être dû à des phénomènes de compensations fonctionnelles ou de dysconnections (Chételat *et al.*, 2006). Des études histologiques et biochimiques ont également mises en évidence une diminution des transporteurs du glucose chez les patients atteints de la MA de même qu'une réduction de l'activité d'enzymes du métabolisme (Ann *et al.*, 2018). Une diminution du taux d'insuline dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et du nombre de récepteurs à l'insuline dans le cerveau ont été également observés. Cette résistance à l'insuline centrale se fait de manière indépendante aux diabètes de type 1 et 2 et c'est pourquoi certains chercheurs parlent de la MA comme étant un diabète de type 3 (Ann *et al.*, 2018).

I.2.3. Autres caractéristiques neuropathologiques

I.2.3.1. Dysfonctionnement du métabolisme du cholestérol

I.2.3.1.1. Les lipides

Les lipides comprennent un grand nombre de molécules chimiquement distinctes. Ils présentent de multiples fonctions biologiques : ils sont à l'origine de la formation de bicouches lipidiques, ils permettent le stockage d'énergie sous forme de gouttelettes lipidiques et peuvent être les précurseurs de nombreux messagers secondaires. Ils sont classés en huit catégories (acides gras, glycérolipides, glycérophospholipides, sphingolipides, stérols, prénols, saccharolipides et polycétides) qui incluent différents sous-types (Figure 7). Le métabolisme

lipidique est particulièrement important dans le système nerveux central (SNC), étant donné qu'il est la structure présentant la plus forte concentration de lipides après le tissu adipeux (Adibhatla et Hatcher, 2007). Ces phospholipides avec le cholestérol et les glycolipides constituent 50-60 % de la masse totale des membranes cérébrales et sont essentiels pour la stabilité, la fluidité et la perméabilité des membranes neuronales. Le maintien d'une composition lipidique et d'une fluidité membranaire appropriée sont essentiels au bon fonctionnement des protéines intégralement membranaires, aux enzymes liées aux membranes ainsi qu'aux récepteurs et canaux ioniques. Les changements dans les niveaux de cholestérol membranaire, le groupe de tête polaire des glycérophospholipides, la longueur de la chaîne acyle des phospholipides ou degré d'insaturation modifient la charge de surface et des propriétés physico-chimiques des membranes. De telles altérations ont été observées lors des processus pathologiques associées aux maladies neurodégénératives telles que la MA. Ceci est particulièrement vrai pour le cholestérol. Alors que le SNC ne représente que 2 % du poids du corps, il contient 23 % du cholestérol présent dans tout l'organisme (Dietschy et Turley, 2004). Dans le SNC, le cholestérol est majoritairement sous forme non estérifiée (> 99,5 %).

I.2.3.1.2. Métabolisme du cholestérol cérébral

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols qui joue un rôle important dans la structure et la fonction des membranes, en particulier celles de la membrane plasmique. Il est nécessaire pour la croissance et la viabilité cellulaire. Sa structure, très hydrophobe, consiste en quatre cycles carbonés notés de A à D avec un groupe hydroxyle sur le carbone 3 (Figure 8). Cette fonction est importante car elle peut réagir avec les acides gras pour donner des esters de cholestérol. Une dérégulation de l'homéostasie du cholestérol est un facteur de risque majeur dans de nombreuses maladies dont la MA.

➤ Synthèse

Les organes assurent leurs besoins en cholestérol par deux mécanismes : la synthèse *de novo* et la capture du cholestérol circulant. Or, des études montrent que le cerveau se distingue par le fait que son cholestérol ne provient pas de celui du plasma par les HDL ou LDL à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE), et que la quasi totalité de ses besoins sont couverts par une synthèse *de novo* (Björkhem, 2006). Cette synthèse diminue au cours de la vie adulte, mais la demi-vie du cholestérol dans le cerveau adulte est très longue et a été estimée à 5 ans chez l'homme (Martins *et al.*, 2009).

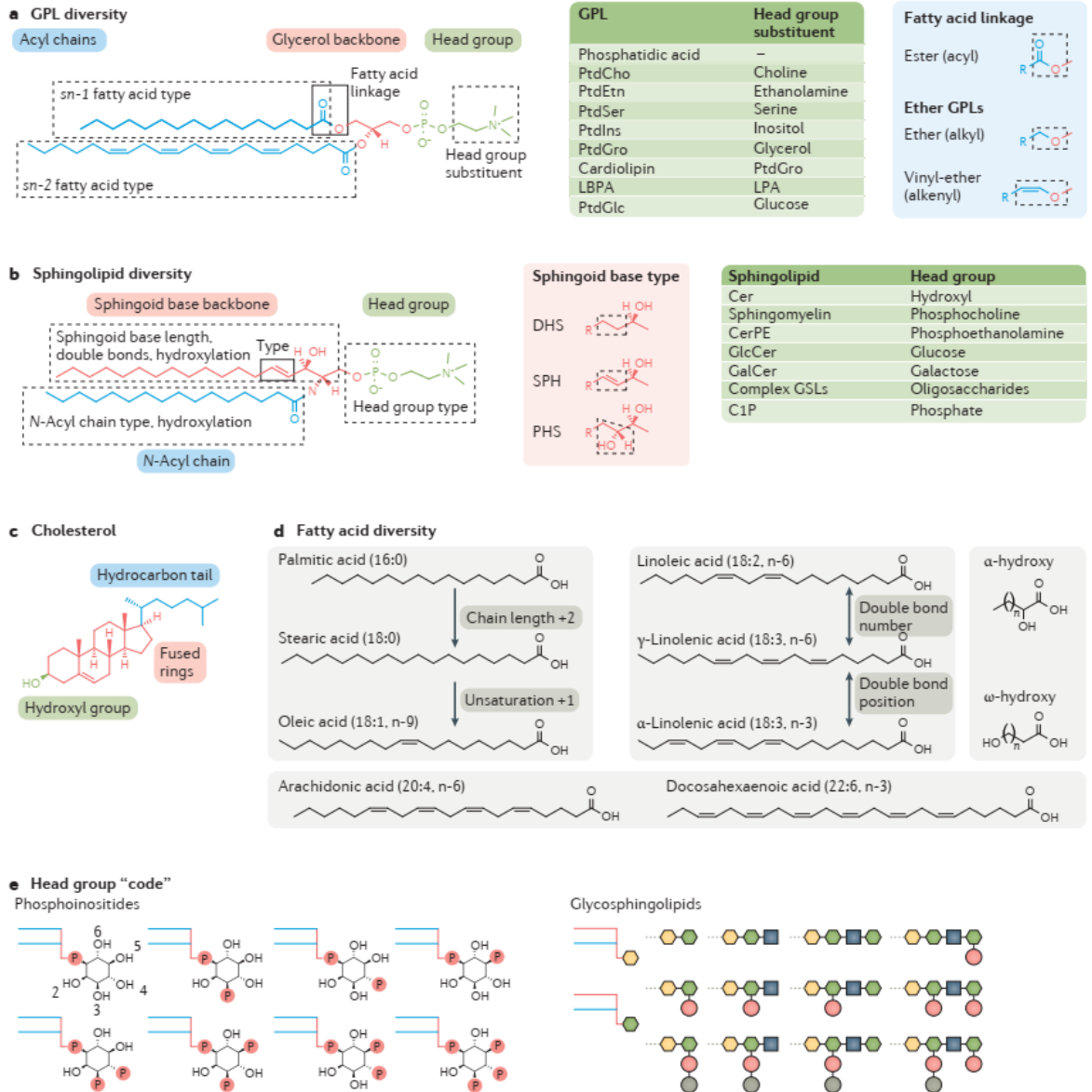


Figure 7: Principales classes et structures de lipides (Harayama et Riezman, 2018). *GPL* : *glycéro-phospholipides*

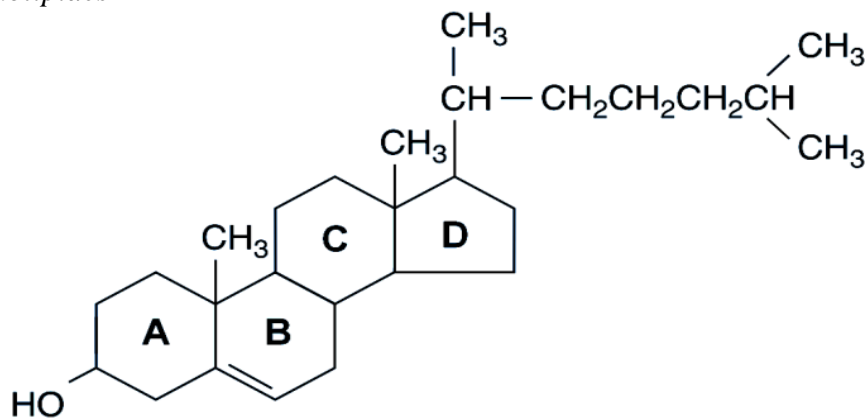


Figure 8 : Représentation du cholestérol en structure plane

Dans le SNC adulte, le cholestérol est synthétisé très majoritairement par les astrocytes et les cellules gliales, dans une moindre mesure par les oligodendrocytes et faiblement par les neurones. Étant donné son rôle crucial dans le fonctionnement du SNC, la synthèse, le métabolisme et l'excrétion du cholestérol sont tous strictement contrôlés (Schreurs, 2010). Il est synthétisé à partir de l'acétyl-CoA par la voie des mévalonates (Figure 9). L'étape limitante et finement régulée est la conversion de 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMGCoA) en mévalonate par la HMG-CoA réductase (HMGCR). Cette enzyme et les suivantes fonctionnent dans la membrane du réticulum endoplasmique de la cellule. Le métabolisme du cholestérol dans le SNC est similaire à celui du reste de l'organisme.

➤ **Transport, stockage et élimination**

Dans les neurones, le cholestérol est incorporé et redistribué au sein des membranes lors des remodelages synaptiques sous forme libre ou estérifiée, lié aux lipoprotéines. L'ApoE est l'apolipoprotéine majoritaire dans le cerveau, synthétisée majoritairement par les cellules gliales, en particulier par les astrocytes qui libèrent dans le milieu des particules ApoE-cholestérol-phospholipides sphériques ou discoïdales complexes, comparables en taille aux HDL et internalisables par les neurones. Ces particules sont assemblées dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) avant d'atteindre les neurones où elles se lient à des récepteurs membranaires de la famille des LRP (*LDL receptor-related proteins*) pour subir l'endocytose. L'endosome résultant du complexe ApoE-cholestérol-phospholipides fusionne avec les lysosomes dont les enzymes hydrolytiques libèrent le cholestérol dans la cellule. Ce dernier est alors stocké après estérification par une acyl-CoA cholestérol acyltransférase (ACAT), ou dirigé vers les membranes. Le cholestérol libre assure un rétrocontrôle négatif sur l'activité de la HMGCR pour réduire la synthèse endogène du cholestérol. Par contre, l'estérification par l'ACAT induit un stockage plus efficace. Ce pool intracellulaire de cholestérol sert de ressource pour la formation et le remodelage des membranes au niveau synaptique et dendritique (Shobab *et al.*, 2005). La synthèse en excès de cholestérol dans le cerveau entraîne une augmentation de son efflux vers le plasma à travers la BHE, ce qui n'est possible qu'après conversion en 24-hydroxycholestérol par la cholestérol 24-hydroxylase ou CYP46 (Björkhem *et al.*, 1997). L'ensemble de ces étapes est illustré par la Figure 9.

I.2.3.1.3. Localisation et trafic du cholestérol cellulaire

Le cholestérol représente 20 à 25% des molécules lipidiques de la membrane plasmique où se trouverait 80 à 90% du cholestérol cellulaire total. Il est abondant aussi dans les endosomes et l'appareil de Golgi, particulièrement le trans-Golgi. À l'inverse, le réticulum endoplasmique

et les membranes mitochondriales internes en contiennent de très faibles quantités (Mukherjee *et al.*, 1998). Le cholestérol affecte plusieurs processus cellulaires en interagissant avec d'autres lipides membranaires et des protéines spécifiques. Sa structure lui confère des propriétés biophysiques particulières comme celle d'augmenter le regroupement et la cohésion des lipides avoisinants, ce qui entraîne une diminution de la fluidité et de la perméabilité membranaire. Cette organisation latérale orchestre la spécialisation de la membrane plasmique. Même s'il n'y a pas de consensus quant à la taille, la dynamique, ou les forces qui gouvernent ces régions, la composition des radeaux lipidiques postule une association préférentielle du cholestérol avec les sphingolipides pour former des plateformes stabilisées par des protéines (Simons et Ikonen, 1997). Contenant 30 à 50% de cholestérol, soit 3 à 5 fois plus que les autres régions membranaires, ces microdomaines très structurés serviraient notamment pour la transduction du signal, le trafic membranaire, et l'adhésion cellulaire (Balasubramanian *et al.*, 2007).

I.2.3.2.4. Taux de cholestérol chez les patients atteints de la MA

➤ Dans le plasma sanguin

De nombreuses études ont rapporté un lien significatif entre un taux de cholestérol plasmatique élevé et une plus grande susceptibilité de développer la MA (Mahley, 2016 ; Tini *et al.*, 2020; Barbiellini ; *et al.*, 2021). Néanmoins, aucun profil lipidique plasmatique particulier n'est pour l'instant clairement associé à la MA, les résultats contradictoires étant certainement le fait de la multitude de facteurs qui peuvent influencer sur les paramètres lipidiques sanguins comme le phénotype de l'ApoE, le stade de la maladie, l'âge ou les aspects nutritionnels.

➤ Dans le cerveau

Les auteurs ont isolé les membranes des cerveaux de patients décédés à différents stades de la maladie et constaté que le taux de cholestérol membranaire augmente significativement au cours de la maladie, étant supérieur à celui des sujets témoins dès le stade modéré et continuant à s'élever au fur et à mesure que la maladie progresse (Zissimopoulos *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018). Une autre étude a détecté davantage de cholestérol dans le cerveau des patients Alzheimer par des méthodes enzymatiques, chimiques et immunohistologiques (Nugent *et al.*, 2020). Le cholestérol serait présent autour des plaques séniles et au niveau des neurites dystrophiques. Les auteurs proposent que l'accumulation du cholestérol soit responsable de l'augmentation de la production du peptide amyloïde par une activité accrue des β - et γ -sécrétases (Marquer *et al.*, 2014).

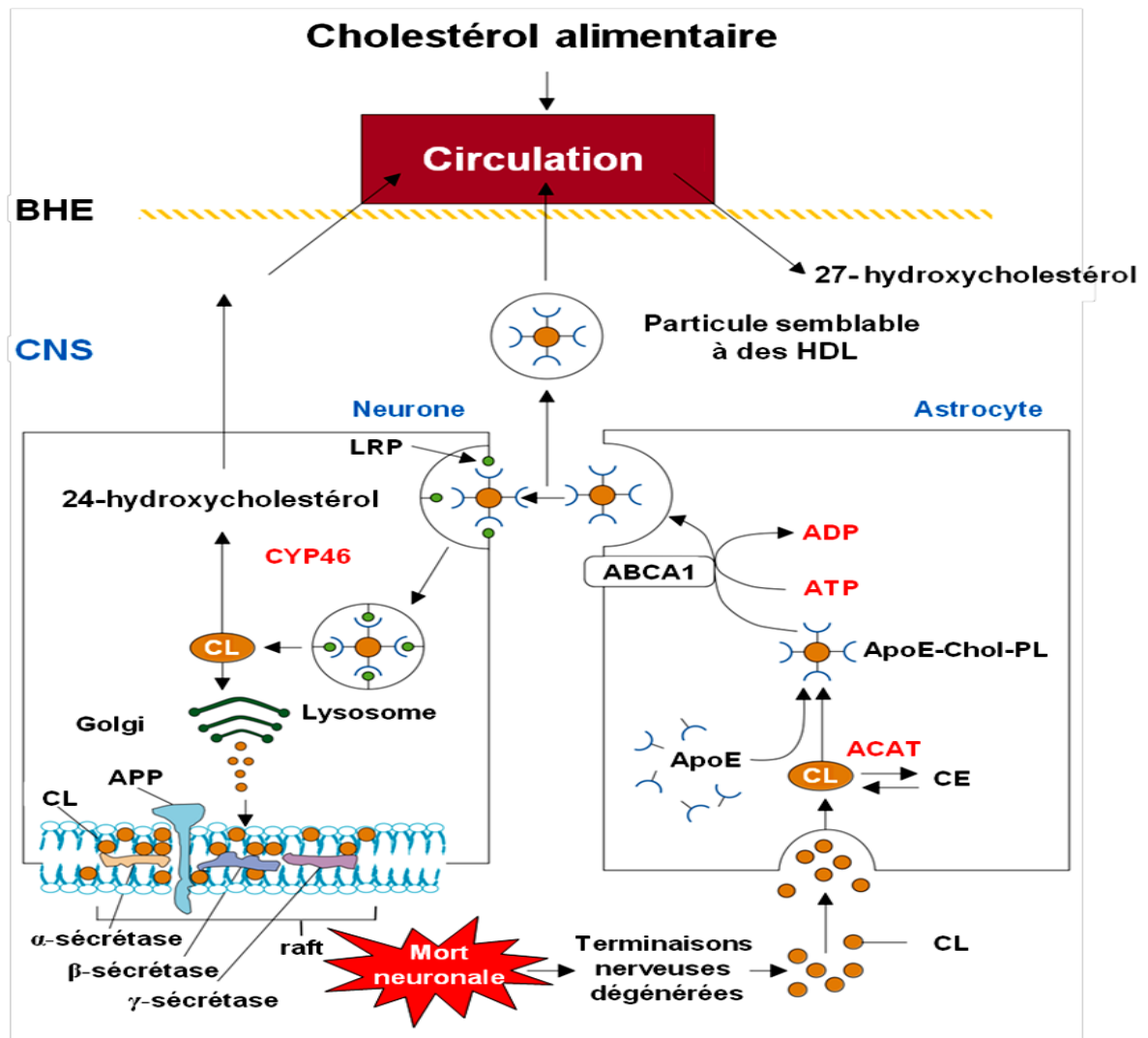


Figure 9 : Métabolisme, transport et internalisation du cholestérol dans le SNC (Shobab *et al.*, 2005). BHE : Barrière Hémato-Encéphalique, CNS : Central Nervous System ou Système Nerveux Central (SNC), HDL : High-Density Lipoproteins, CL : Cholestérol Libre, CE : Cholestérol Estérifié, LRP : Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein ABCA1 : ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1

I.2.3.2.5. Modulation des taux de cholestérol : impact sur la MA

➤ Statines

Les statines sont des inhibiteurs pharmacologiques de la HMG-CoA réductase, utilisés comme médicaments pour baisser la cholestérolémie de personnes à risque pour les maladies cardiovasculaires et présentant des taux de cholestérol élevés (Barone *et al.*, 2014). Les études *in vitro* sur des lignées neuronales surexprimant la protéine APP montrent que les statines augmentent l'activité α -sécrétase, diminuant donc la sécrétion du peptide A β (Tini *et al.*, 2020). La diminution de la production amyloïde a aussi été démontrée *in vivo* chez des souris transgéniques modèles de MA traitées par des statines (Langness *et al.*, 2021) et corrélée à une

protection contre la perte de mémoire. À l'inverse, des régimes riches en cholestérol augmentent le nombre de plaques séniles. Chez l'homme, des études épidémiologiques ont montré une diminution de la prévalence de la MA chez les patients atteints de pathologies cardiovasculaires traités par des statines (Mahley, 2016).

➤ **Acylcoenzyme A cholesterol acyltransférase (EC 2.3.1.26)**

Des travaux ont montré qu'il ne semble pas nécessaire de modifier la concentration de cholestérol pour déréguler la production du peptide A β . Une simple redistribution du cholestérol dans la cellule semble suffisante pour altérer le clivage de la protéine APP. L'acylcoenzyme A cholesterol acyltransférase (ACAT) est une enzyme qui génère des esters de cholestérol à partir du cholestérol libre. Une inhibition de cette enzyme améliore les performances cognitives chez les souris transgéniques modèles de MA tout en réduisant la pathologie amyloïde en diminuant le nombre de plaques séniles (Hutter-Paier *et al.*, 2004 ; Huttunen *et al.*, 2010).

➤ **Cholestérol 24-hydroxylase (EC 1.14.13.98)**

La cholestérol 24-hydroxylase ou CYP46A1 convertit le cholestérol en 24S-hydroxycholestérol (24S-OHC) afin d'être exporté dans la circulation sanguine. Une surexpression de cette enzyme diminue la quantité de peptide A β et des plaques séniles et améliore les performances cognitives des souris (Langness *et al.*, 2021). Le mécanisme mis en jeu est encore mal connu, mais passerait par la diminution de l'activité γ -sécrétase. À l'inverse, l'inhibition de CYP46A1 augmente la production de peptide A β dans le cerveau. Un médicament ciblant les lipides cérébraux est l'Efavirenz (en phase clinique), qui active l'enzyme CYP46A1 pour favoriser la conversion de l'excès de cholestérol en 24S-OHC qui peut être sécrété via la BHE et réduire ainsi l'accumulation du cholestérol cérébral. Efavirenz abaisse les niveaux de protéines tau dans les neurones de patients atteints de la MA et améliore le comportement chez les souris transgénique 5xFAD (Petrov et Pikuleva, 2019; van der Kant *et al.*, 2019).

I.2.3.2. Implication du stress oxydant dans la pathogénie de la MA

I.2.3.2.1. Le stress oxydant

Le stress oxydatif (ou stress oxydant) est défini comme étant un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène, ou ROS (*Reactive Oxygen Species*), et les défenses antioxydantes d'un organisme ou d'une cellule (Brigelius-Flohé, 2009).

➤ **Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)**

Les ROS sont des radicaux et des molécules dérivés de la réduction incomplète de l'oxygène moléculaire (figure 10).

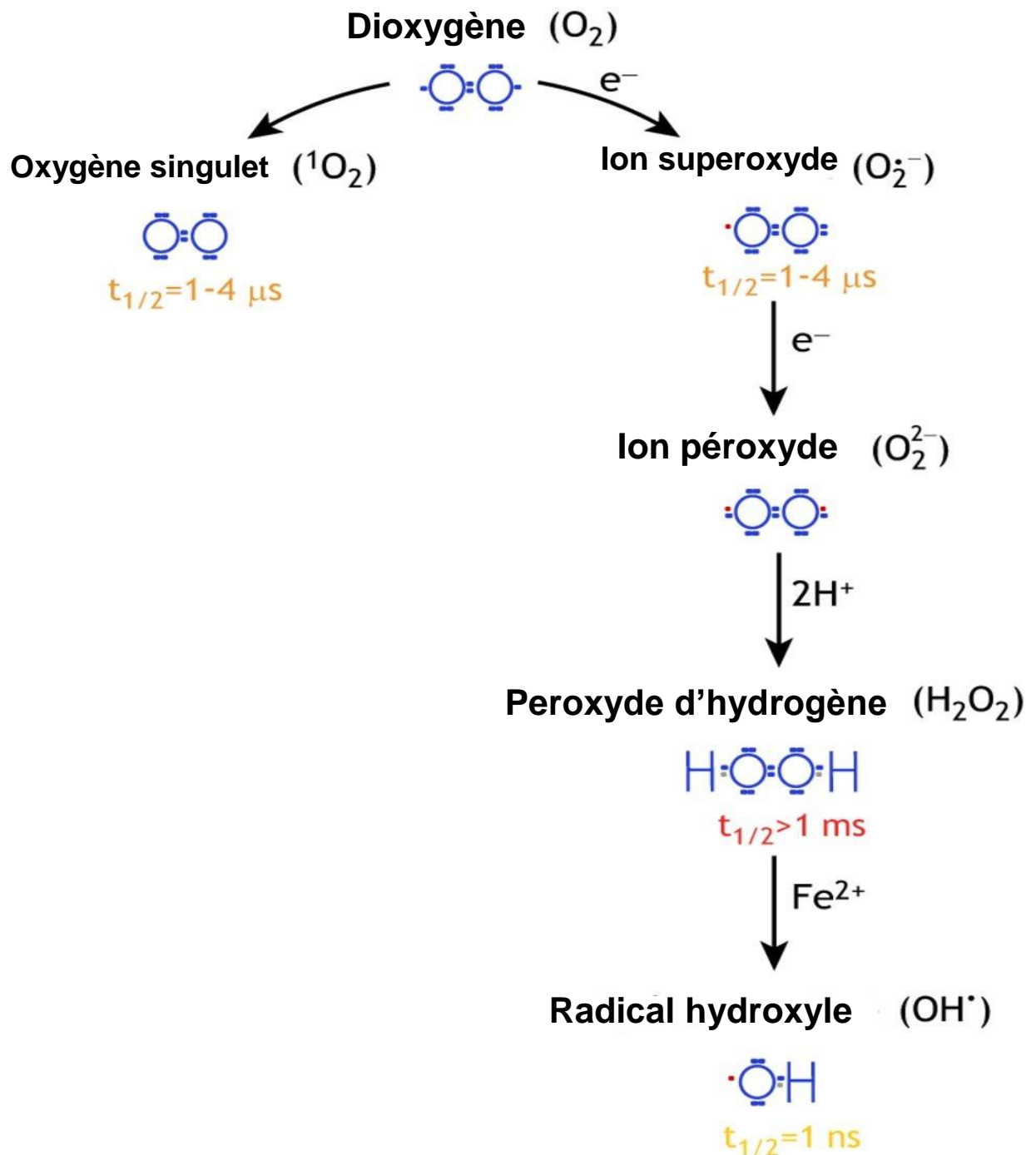


Figure 10: Espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Mhamdi et Van Breusegem, 2018).

La structure de Lewis de chacune de ces ROS est présentée en bleue, avec les électrons libres en rouge. La demi-vie ($t/2$) est donnée pour chaque ROS.

En effet, l'excitation de l'oxygène produit de l'oxygène singulet, tandis que la réduction produit l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est le produit de la réduction d'un électron du superoxyde ; le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) est le résultat de la troisième réduction de l'oxygène sous un électron et peut être produit en présence d'ions métalliques et de H_2O_2 .

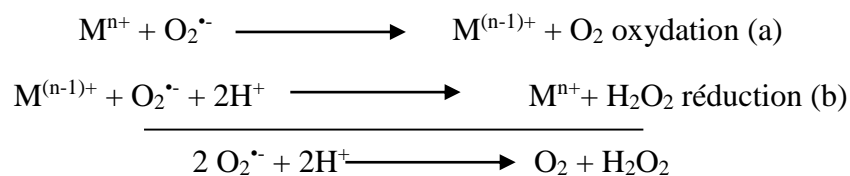
Elles sont produites en petite quantité, et sont nécessaires au maintien de l'homéostasie dans les cellules et jouent un rôle important dans la signalisation. Les ROS sont également des oxydants réactifs capables d'endommager les biomolécules (Halliwell et Gutteridge, 1999 ; Mhamdi et Van Breusegem, 2018).

➤ **Le système de défense antioxydants**

Afin de contrôler la quantité de pro-oxydants (ROS) et prévenir les dommages sur les biomolécules, l'organisme dispose de mécanismes de protection, notamment des antioxydants enzymatiques :

▪ **Les superoxydes dismutases (SOD)**

Les SOD, découvertes en 1969 par Fridovitch, sont des métalloenzymes ubiquitaires chez les eucaryotes (McCord et *al.*, 1969). Elles catalysent la dismutation de deux anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène (Brawn et Fridovich, 1980). Il existe plusieurs SOD qui ont toutes la propriété d'être liées à un métal, le cuivre, le zinc ou le manganèse, qui va servir au transfert d'électron :

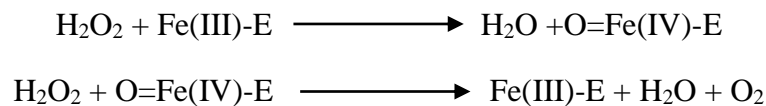


M représentant la métalloenzyme, M^{n+} à l'état oxydé et $M^{(n-1)+}$ à l'état réduit.

Trois sortes de SOD ont été identifiées dans la cellule eucaryote. La SOD1 à cuivre et à zinc (Cu-ZnSOD) que l'on retrouve principalement dans le cytosol. Le cuivre (Cu^{2+}) est nécessaire à l'activité catalytique de l'enzyme, tandis que le zinc aide uniquement à la stabilisation de l'enzyme. La SOD2 à manganèse (MnSOD) siège au niveau de la matrice mitochondriale. Chaque sous-unité comporte un atome de manganèse (Mn^{3+}) indispensable à l'activité catalytique. La SOD3 ou EC-SOD, à cuivre et à zinc est une protéine sécrétée et présente principalement dans le milieu extracellulaire (McCord et *al.*, 1971).

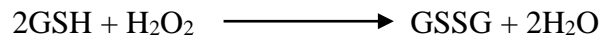
▪ La catalase

C'est une enzyme que l'on retrouve principalement au sein des peroxysomes, dans les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales. Elle catalyse la dismutation de H₂O₂ en oxygène et en eau. Cette enzyme est constituée de quatre chaînes polypeptidiques, comportant chacune un atome de Fer sous forme ferrique (Fe³⁺). Ces derniers constituent les sites actifs de cette enzyme (Kirkman et *al.*, 2006). L'hème contenu au sein des catalases décompose le H₂O₂ par un mécanisme en deux étapes dans lequel le H₂O₂ s'oxyde et réduit le fer héminique dans le site actif. Dans la première étape, une molécule de H₂O₂ oxyde l'hème en une espèce oxyferryl. Dans la seconde étape, une seconde molécule H₂O₂ est utilisée comme agent réducteur pour régénérer l'enzyme, la production d'eau et d'oxygène. Le mécanisme de dismutation du peroxyde d'hydrogène est le suivant :



▪ Les glutathion peroxydases

Les glutathion peroxydases (GPx) catalysent la décomposition de H₂O₂ en couplant sa réduction en eau avec l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en bisulfure de glutathion (GSSG) (Athur, 2000)



Outre le H₂O, les GPx peuvent réduire de nombreux peroxydes tels que les hydroperoxydes lipidiques (ROOH) transformés en groupement alcool (ROH). Le GSH reste toujours le donneur d'hydrogène. Les GPx sont composées de quatre sous-unités, chacune contenant un atome de sélénium essentiel à l'activité enzymatique. Les GPx sont majoritairement localisées dans le cytoplasme. Une proportion plus faible est présente dans la matrice mitochondriale (Brigelius-Flohé, 2009).

Les effets de ces enzymes antioxydantes ne doivent pas être envisagés isolément. En effet la fonction synchronisée des activités de ces enzymes antioxydantes protège la cellule d'une production excessive des ROS et du stress oxydant secondaire tout en maintenant les concentrations physiologiques (Figure 11) (Saez et Estan-Capell, 2014).

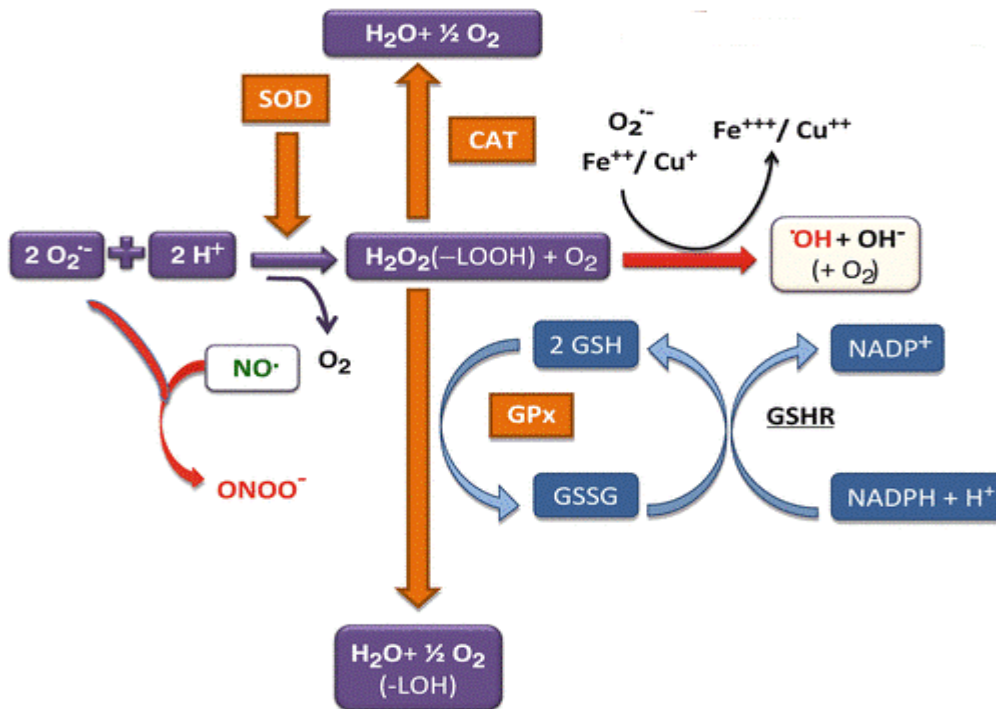


Figure 11 : Fonction synchronisée des activités enzymatiques de la SOD, CAT et GPx (Saez et Estan-Capell, 2014). *SOD* : superoxyde dismutase ; *CAT* : catalase ; *GPx* : glutathion peroxydase ; *GSHR* : glutathion réductase ; *LOOH* : hydroperoxydes lipidiques

Cependant, dans certaines maladies telles que la MA, un déséquilibre peut apparaître entre les antioxydants et les pro-oxydants, en raison d'une production de ROS plus élevée ou d'une activité réduite des enzymes responsables de la dégradation des ROS, entraînant des dommages oxydatifs sur les biomolécules.

I.2.3.2.2. Stress oxydatif et la maladie d'Alzheimer

➤ Marqueurs du stress oxydatif dans la maladie d'Alzheimer

Le stress oxydatif peut être un événement précoce dans l'étiologie de la MA, car des marqueurs de l'oxydation apparaissent dans les régions cérébrales à déficience cognitive légère. Il peut y avoir différentes origines, mais la surproduction de ROS est considérée comme une contribution majeure. Le cerveau a de nombreuses sources capables de générer des ROS et une grande capacité d'oxydation (par son grand contenu en acides gras polyinsaturés), mais, ses capacités à les neutraliser sont très faibles (Halliwell et Gutteridge, 1999).

▪ Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés (AGPI) tels que l'acide arachidonique (AA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) par les ROS produit des aldéhydes réactifs (*Reactive Aldehydes* (RAs)) (Figure 12). Ces aldéhydes peuvent être plus destructeurs

que les ROS puisqu'ils ont une demi-vie plus longue (minutes à heures comparées aux microsecondes à nanosecondes de la majorité des radicaux libres). Aussi, la structure non chargée de ces molécules leur permet de migrer du site de production à travers les membranes hydrophobiques (Pohl et Jovanovic, 2019). Leurs taux sont augmentés dans le cerveau et le LCR des personnes atteintes de la MA.

En effet, les patients atteints de désordres cognitifs présentent une augmentation du 4-hydroxynonéal (4-HNE) lié aux enzymes (ATP synthase, α -enolase, aconitase, aldolase glutamine synthase, Mn-SOD) et aux protéines (peroxyredoxine 6, dihydropyrimidinase reliée à la protéine-Z, α -tubuline) qui sont associées au métabolisme du glucose, au maintien des taux de glutamate, au système de défense antioxydant, à la croissance axonale et au maintien du cytosquelette (Butterfield *et al.*, 2010). Le 4-HNE réagit aussi avec l'ADN et les phospholipides, produisant des adduits covalents intra- et inter-moléculaire. La liaison de 4-HNE aux histones altère leur capacité à se lier à l'ADN, contribuant ainsi à la vulnérabilité des neurones (Butterfield *et al.*, 2010). Le 4-hydroxyhexenal (4-HHE) un autre aldéhyde, comporte un carbone γ déficient en électrons qui réagit avec les nucléophiles tels que les thiols ou les amines et un groupe carbonyle qui forme des bases de Schiff avec les groupements amino. Les taux de 4-HHE liés aux protéines sont élevés dans le gyrus hippocampique et parahippocampique des patients atteints de MCI ou de MA préclinique ou à un stade avancé. La peroxydation lipidique joue donc un rôle crucial dans la progression de la MA (Bradley *et al.*, 2012).

L'acroléine (2-propène-1-al) est l'aldéhyde le plus réactif, agissant sur de nombreuses molécules. Elle peut alkyler les centres nucléophiles des macromolécules, comme les résidus cystéine, histidine et lysine des protéines, avec lesquels elle forme des dérivés carbonyles. Sa liaison aux protéines est d'ailleurs un marqueur puissant des dommages protéiniques oxydatifs car elle induit un stress oxydant. Elle modifie les bases de l'ADN en s'associant aux sites nucléophiles pour former des adduits exocycliques. Les taux d'acroléine sont augmentés dans l'hippocampe et le cortex temporal des malades (Luo et Shi, 2005).

Le malondialdéhyde (MDA) présente lui aussi des taux très élevés dans le sérum des patients atteints de la MA (Aybek *et al.*, 2007). Cet aldéhyde possède un plus fort potentiel mutagénique et carcinogénique dans les cellules des mammifères comparé au HNE (Pohl et Jovanovic, 2019).

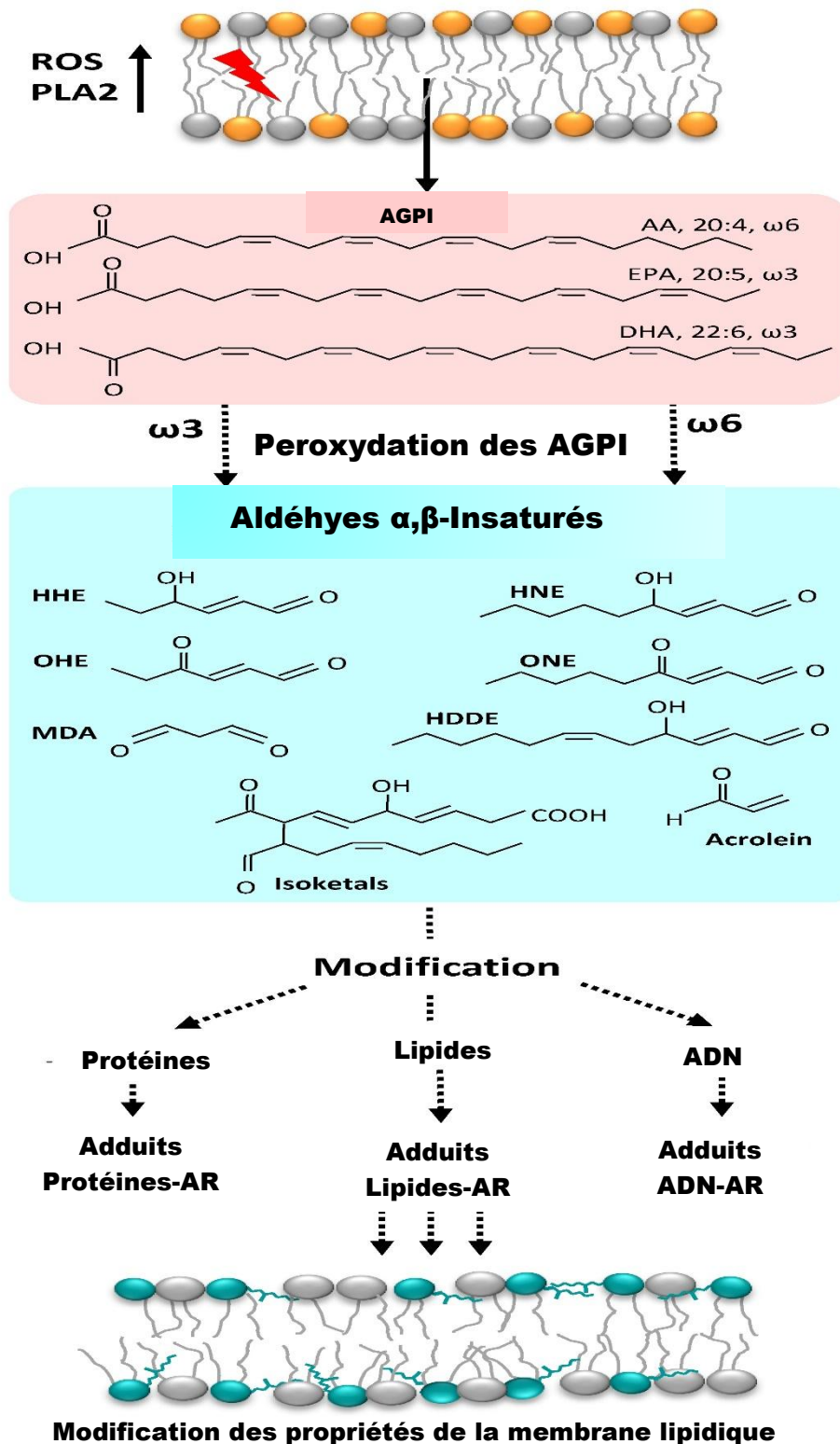


Figure 12 : Formations des aldéhydes réactifs lors de la peroxydation des AGPI (Pohl et Jovanovic, 2019). Des taux élevés de ROS induisent la peroxydation des AGPI et la formation des différents aldéhydes réactifs α , β -insaturés qui peuvent réagir avec les protéines, lipides et ADN. AA : acide arachidonique, DHA : acide docosahexaénoïque, EPA : acide eicosapentaénoïque, PLA2 : phospholipase A2, AR : aldéhydes réactifs

▪ **Autres marqueurs du stress oxydant**

La présence de dommages sur les acides nucléiques (en particulier la formation de la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG)) et de modifications des protéines sont également observées dans les régions présentant des neurofibrilles ou des dépôts amyloïdes, ainsi que sur les protéines A β et tau elles-mêmes (Butterfield *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 1997). Les marqueurs enzymatiques de stress oxydant (CAT, SOD, GPx) sont aussi augmentés dans l'hippocampe et le complexe amygdalien des malades d'Alzheimer (Suh *et al.*, 2002).

I.2.3.2.3. Rôle dans l'aggrégation du peptide amyloïde et la formation de plaques séniles

Les zones cérébrales où la mort cellulaire intervient et où l'établissement d'un stress oxydant a été déterminé sont étroitement associées avec le dépôt des plaques séniles, impliquant l'hypothèse selon laquelle les peptides A β -40 et -42 agrégés sont directement responsables des dommages cellulaires irréversibles liés à la libération des ROS (Bush, 2003). Dans le cerveau des patients atteints de la MA, une forte concentration métaux, notamment de Cu, Fe a été détectée dans les plaques amyloïdes (400 μ mol/L) (Lovell *et al.*, 1998). En effet, les ions Cu²⁺ en complexe avec les fibrilles β -amyloïdes produisent de l'H₂O₂, en présence d'agents réducteurs biologiques (Figure 13). Lorsque le rapport entre le Cu et le peptide augmente, les niveaux d'H₂O₂ et la production de radicaux hydroxyles augmentent, et la morphologie des agrégats passe de fibrillaire à amorphe, premier signe de formation des plaques séniles. L'élimination du Cu²⁺ du peptide A β empêche l'aggrégation amyloïde *in vitro*, favorise sa dégradation et prévient la formation d'H₂O₂. Par conséquent, il diminue la mortalité cellulaire. En raison de ces effets positifs de l'élimination du Cu, certaines études *in vitro* ont ciblé les chélateurs du Cu comme médicaments appropriés. De manière similaire à l'interaction cuivre-A β , la liaison du fer à A β entraîne une réduction de Fe³⁺ en Fe²⁺ et la génération de H₂O₂. De plus, l'APP fonctionne comme une ferroxidase majeure sur la membrane plasmique et est régulée par les taux de fer cellulaire. Une augmentation du fer intracellulaire augmente l'expression de l'APP, tandis que l'exposition aux chélateurs du fer diminue son expression dans les cellules de neuroblastome (Cheignon, *et al.*, 2018).

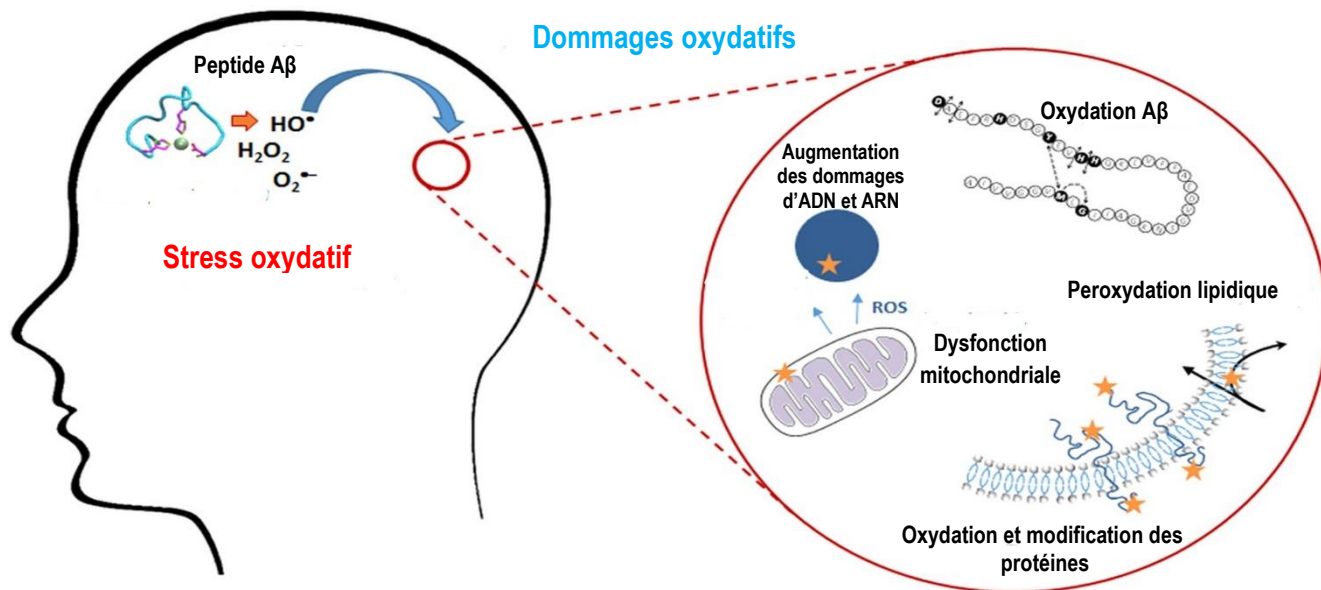


Figure 13 : Production de ROS par les peptides A β en présence d'ions métalliques (Cheignon, et *al.*, 2018).

Il apparaît donc clairement à quel point le contrôle du métabolisme de ces métaux de transition est important, en termes de concentration, de transport, de stockage d'incorporation dans des sites actifs (Cheignon, et *al.*, 2018).

I.2.3.3. Aluminium et maladie d'Alzheimer

L'aluminium (Al) est bien connu depuis les 100 dernières années pour sa neurotoxicité (Oshima et *al.*, 2013). C'est un des métaux les plus abondants dans l'environnement. Une fois absorbé dans l'organisme, il se fixe majoritairement à la transferrine plasmatique ou avec le citrate afin de traverser la BHE pour atteindre le cerveau. Son transport dans ce dernier permet de comprendre son implication dans une variété de troubles neurologiques mais le mécanisme exact de sa toxicité reste encore inconnu. Les études expérimentales réalisées chez les rats et les souris ont montré que l'Al s'accumule dans le cortex cérébral, l'hippocampe et le cervelet après une administration par voie orale ou parentérale. De nombreux laboratoires ont documenté une accumulation d'Al dans les cerveaux Alzheimer, et plus particulièrement dans les DNF mais pas dans les plaques séniles (Campbell et *al.*, 2004). Il a donc été suggéré que l'administration au long cours d'Al aurait un lien avec le risque de développer une MA (Singla et Dhawan, 2014). Les études comparatives ont permis de mettre en évidence que l'Al se liait au peptide A β forme un complexe capable d'augmenter l'agrégation des dépôts A β en

comparaison à l'A β seul, ce qui induit des changements conformationnels qui peuvent inhiber la dégradation des dépôts. Ce phénomène est à mettre en lien avec le fait que l'Al augmente l'expression de l'APP, de PS1 et de BACE-1, il augmente également les taux de A β 42 et diminue les taux de A β 40 dans le cortex de rats recevant une injection plus ou moins dosée de maltolate d'aluminium.

Des études fréquentes ont confirmé que les concentrations d'Al sont augmentées dans les cerveaux des patients Alzheimer en raison de la consommation de nourriture et d'eau potable contenant l'Al (Buraimoh et *al.*, 2012). Il a été établi que Al³⁺ comme le Zn²⁺ et Cu²⁺ se trouvent co-localisés avec des feuillettes d'A β 42 dans les plaques séniles dans le cerveau des patients Alzheimer (Kawahara et Kato-Negishi, 2011). Le taux élevé d'Al favorise également la production de la protéine tau et par conséquent la formation de la DNF, la stimulation du processus oxydatifs des cellules gliales, et donc endommager l'intégrité des neurones (Campbell et *al.*, 2004). De plus l'Al médie la libération des neurotransmetteurs et des activités enzymatiques. Cela montre un lien entre l'Al et l'hypothèse la cascade amyloïde de la MA (Moore et *al.*, 2000).

I.2.3.4. Perturbation de l'homéostasie calcique

I.2.3.4.1. Homéostasie du calcium intracellulaire

L'ion calcium (Ca²⁺) est un second messenger ubiquitaire et universel, impliqué, de fait, dans un large panel de fonctions (Verkhatsky et Butt, 2013). L'entrée de Ca²⁺ en provenance du milieu extracellulaire est prise en charge par les canaux calciques dépendants du voltage, les récepteurs ionotropiques associés à une conductance calcique, des canaux cationiques de la famille des *Transient receptor potential channels* (TRPs), l'échangeur sodium/calcium (NCX) et des canaux activés par la déplétion des stocks internes. La libération de Ca²⁺ à partir du réticulum passe par l'activation de deux types de canaux intracellulaires, les récepteurs à l'IP3 (*inositol-1,4,5-trisphosphate*) et ceux sensibles à la ryanodine (RyR) (Berridge et *al.*, 2003). Ces récepteurs participent à un phénomène régénératif des mouvements de Ca²⁺ par l'intermédiaire d'un processus appelé *Ca²⁺ induced Ca²⁺ release* (CICR). Les récepteurs de la ryanodine et de l'IP3 sont activés par une augmentation de Ca²⁺ libre cytosolique qui exerce alors un rétrocontrôle positif sur leur activation et participe ainsi au phénomène régénératif qui permet la propagation de la signalisation au sein d'une cellule, de proche en proche. Cependant, lorsque la concentration de Ca²⁺ devient trop élevée, l'effet du Ca²⁺ inhibe les récepteurs RyR et IP3. Lors de ces contextes d'excès de Ca²⁺ intracellulaire, des systèmes d'extrusion fonctionnant contre le gradient de concentration du Ca²⁺ se mettent en place, comme la pompe

PMCA (plasmalemmal Ca^{2+} -ATP-ase) et l'échangeur sodium/calcium (NCX). Au niveau du réticulum la pompe SERCA (sarcoplasmic reticulum ATP-ase) permet la recapture lors des fortes augmentations de Ca^{2+} (Berridge *et al.*, 2003). Ainsi, ces différents outils associés aux protéines tampon (telles que les calmodulines) permettent une régulation fine de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} libre, avec pour finalité de restreindre les phénomènes de toxicité en n'ayant de cesse de tamponner, extruder ou recapter cet ion.

I.2.3.4.2. Perturbation de l'homéostasie calcique

Au début des années 1990, des augmentations massives de Ca^{2+} intra neuronales furent observées sur des cultures de neurones foetaux corticaux humains exposés à des concentrations d'A β 1-38/25-35 comprises entre 1 et 80 μM pendant 4 jours (Mattson *et al.*, 1992). Ces expositions massives et prolongées étaient également liées à une mort neuronale importante. L'hypothèse de l'époque, qui a persisté pendant près de deux décennies, consistait en la capacité ionophorétique d'A β à former de larges pores membranaires perméables au Ca^{2+} . En effet, l'A β oligomérique soluble s'insérerait dans la membrane plasmique des neurones et cellules gliales et générerait la production de radicaux libres. Ces derniers induiraient une désorganisation de la membrane plasmique, conduisant à des processus critiques tels que la perte de l'homéostasie du calcium, la perte de certaines fonctions protéiques et l'activation de processus pro-apoptotiques (Smith *et al.*, 2000). Ces entrées de Ca^{2+} seraient alors amplifiées par des relâchements de calcium via le réticulum endoplasmique. Plus récemment, l'hypothèse calcique a évolué en une modulation des acteurs de la signalisation calcique au sens large (Rush et Buisson, 2014).

I.2.3.5. Altérations de la neurotransmission cholinergique

Il existe quatre grands systèmes de stimulation, ascendants, non spécifiques, pour le cortex cérébral, les systèmes cholinergiques, noradrénergique, dopaminergique et sérotoninergique. Ces systèmes "diffus" sont très importants pour la mémorisation, l'attention et la motivation. Ils sont très vulnérables aux processus du vieillissement particulièrement le système cholinergique directement impliqué dans la physiopathologie de la MA. Les neurones cholinergiques utilisent l'acétylcholine (ACh) pour la neurotransmission. L'enzyme de synthèse, la choline acétyltransferase (ChAT) (Figure 14) ainsi que les vésicules transporteur d'ACh sont situées dans le compartiment présynaptique uniquement, alors que l'enzyme de dégradation, l'acétylcholinesterase (AChE), se trouve à la fois dans les compartiments présynaptiques du neurone cholinergique et postsynaptique du neurone cholinocéptif (Smiley *et al.*, 1997). Le compartiment postsynaptique répond à l'ACh par l'intermédiaire de récepteurs

de type muscarinique ou de type nicotinique. La glie adjacente contient de la butyrylcholinesterase (BChE).

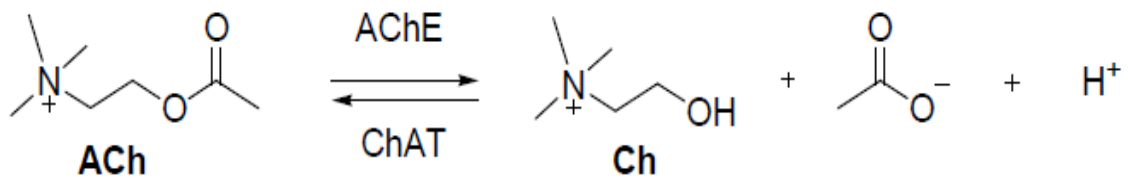


Figure 14 : Synthèse et dégradation de l'acétylcholine

Une détérioration de la voie cholinergique ou une grave déplétion en acétylcholine est associée à la MA. En effet, dans les parties endommagées du cerveau des patients atteints de la MA, on observe une perte importante de neurones cholinergiques avec de faibles niveaux d'ACh dans l'espace intersynaptique. Lors de la progression de la maladie, l'activité de l'AChE diminue. Cela devrait entraîner une augmentation du taux d'ACh, mais il existe une autre enzyme de la même famille, la BuChE, qui reconnaît également l'ACh comme substrat (Scarpini *et al.*, 2003) et dont l'activité croît au cours de la maladie. Ceci serait probablement dû à la prolifération des cellules gliales (des changements de ratios AChE/BuChE ont aussi été reportés) (Arendt *et al.*, 1992). Ce déficit se traduit par une diminution des fonctions cognitives suite à une diminution de l'activation des récepteurs cholinergiques nicotiques et muscariniques (type M) (Davous et Delacourte, 1999).

I.2.4. Facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer et traitements disponibles

I.2.4.1. Facteurs de risque

I.2.4.1.1. Facteurs de risque non modifiables

Les facteurs non-modifiables comprennent l'âge, le sexe ainsi que des déterminants génétiques. La MA est une maladie de la vieillesse et ne se déclare pas avant la soixantaine d'années. Le risque de développer la MA est augmenté par le sexe, en effet, la prévalence de la MA est plus élevée chez les femmes (GBD 2016 Dementia Collaborators, 2019; Hou *et al.*, 2019) (Fig. 12). En outre, des mutations autosomiques dominantes dans les gènes codant pour l'APP et les présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2), qui sont les sous-unités catalytiques de la γ -secrétase (Carrillo-Mora *et al.*, 2014), sont responsables de la forme familiale héréditaire de la MA qui se manifeste vers l'âge de 60 ans (Silva *et al.*, 2019). Le fait d'être porteur de ces mutations est associé à une probabilité supérieure à 85% d'être atteint de la MA (Reitz *et al.*, 2011). Cependant, la forme familiale est responsable de moins de 5% des cas d'Alzheimer, les 95% restants étant dus à la forme sporadique qui se déclare plutôt après 65 ans (Agostinho *et*

al., 2015; Silva *et al.*, 2019). Le facteur de risque génétique le plus fortement mis en cause dans la forme sporadique de la MA est le gène codant pour l'apoE, en particulier l'allèle ε4.

I.2.4.1.2. Facteurs de risque modifiables

Il existe également un très grand nombre de facteurs de risque modifiables. Les maladies cardiovasculaires, le stress, le niveau d'éducation, la sédentarité, le tabagisme, le diabète de type 2 ou encore une mauvaise alimentation sont favorables au développement de la MA (Winblad *et al.*, 2016; Armstrong, 2019; Silva *et al.*, 2019). La malnutrition en particulier, n'est pas peu commune parmi les personnes âgées. Elles sont souvent victimes d'anorexie et/ou de dysphagies pouvant induire un état de dénutrition (Willis, 2017) qui contribuerait au développement des enchevêtrements neurofibrillaires (Armstrong, 2019).

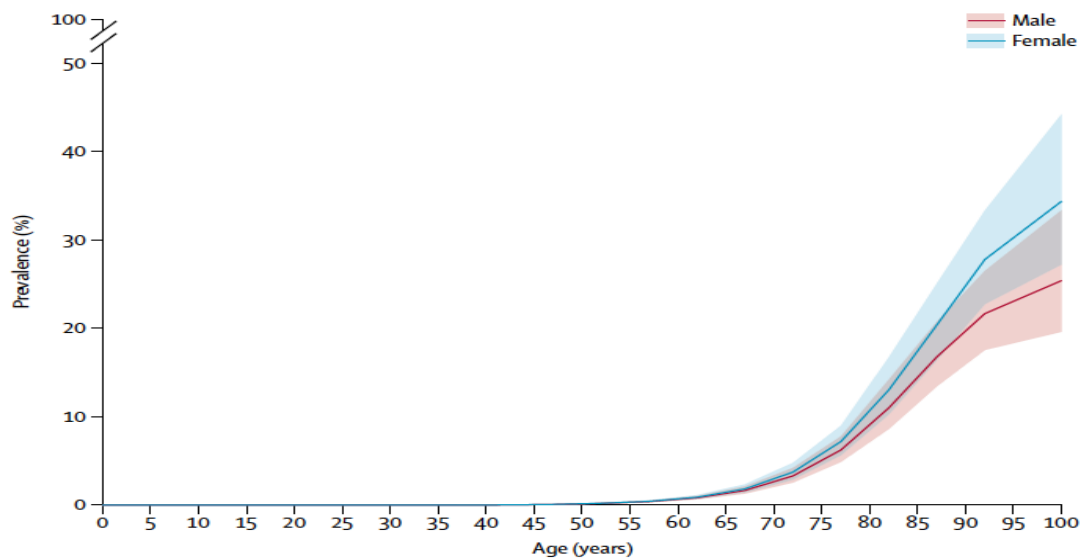


Figure 15 : Prévalence mondiale de la maladie d'Alzheimer selon l'âge et le sexe. (GBD 2016 Dementia Collaborators, 2019).

La prévalence est exprimée en pourcentage de la population atteint par la maladie en 2016, entouré de son intervalle de confiance à 95%. La courbe des femmes est bleue, la courbe des hommes est rouge

I.2.4.2. Les traitements

Les options thérapeutiques actuellement disponibles sur le marché sont d'une efficacité limitée et purement symptomatique (Tayeb *et al.*, 2012). Seules quatre molécules possèdent une autorisation de mise sur le marché : le donézépil, la galantamine, la rivastigmine et la mémantine (Graham *et al.*, 2017). Cependant, plus récemment une nouvelle molécule bien que

controversée a été approuvée par la FDA (*Food and Drugs Administration*) l'Aduhelm. Il s'agit d'un anti-corps monoclonal dirigé contre les formes agrégées solubles et insolubles du peptide (Alzheimer's association, 2021). Le donézépil, la galantamine et la rivastigmine sont des inhibiteurs de cholinestérase qui sont prescrits dans les phases les moins avancées de la maladie (MA modérée). En effet, leur administration a pour but de freiner la chute d'acétylcholine qui survient à mesure que la maladie progresse (Tayeb *et al.*, 2012). La mémantine est un antagoniste non compétitif du récepteur NMDA qui permet de neutraliser les effets excitotoxiques consécutifs à la libération excessive de glutamate (Tayeb *et al.*, 2012). Aucun de ces traitements n'est capable d'empêcher ni de ralentir les dommages neuronaux observés dans la MA, responsables des symptômes cognitifs (Alzheimer's Association, 2016, 2021). Compte tenu des facteurs de risque et de l'inefficacité des traitements actuels, il n'est pas surprenant que le nombre de patients atteints de la MA ne cesse de croître.

I.2.5. Modèles animaux de la MA

La reproduction de la pathologie Alzheimer chez l'animal est depuis longtemps un défi technique pour la recherche sur la MA et représente un outil indispensable. Ainsi, plusieurs modèles de la MA ont vu le jour au cours des dernières décennies.

I.2.5.1. Modèles transgéniques

La manipulation de gènes impliqués dans la genèse des marqueurs de la MA est l'une des stratégies les plus largement utilisées pour modéliser la MA chez l'animal. De nombreux animaux ont permis de mettre en œuvre des modèles de la MA, tels que le rat ou certains invertébrés comme la drosophile (*Drosophila melanogaster*) ou le ver *Caenorhabditis elegans*, mais la majorité des modèles a été mise au point chez la souris (Hou *et al.*, 2019). Les souris transgéniques sont de loin les plus utilisées, elles expriment des mutations humaines de la protéine APP seule (souris APP23, souris Tg2576 ou souris PDAPP), ou combinées aux présénilines humaines mutées (souris APP/PS1, souris 5xFAD) (Webster *et al.*, 2014). Toutes ces souris sont de ce fait des modèles de la forme familiale de la MA. Il n'existe pas, à ce jour, de modèle de la forme sporadique (Foidl et Humpel, 2020). Des souris exprimant des formes mutées de la protéine tau ont également été créées. Cependant, à ce jour, aucune mutation de tau n'a été identifiée dans Alzheimer (Iqbal *et al.*, 2016).

I.2.5.2. Modèles d'injection intracrânienne de peptides amyloïdes

Une stratégie alternative à la transgénèse a émergé après que le lien entre déclin cognitif et formes solubles de peptides A β a été mis en lumière : l'injection intracérébrale de peptides

amyloïdes (Chambon *et al.*, 2011). Contrairement aux modèles transgéniques, l'évaluation des atteintes cellulaires, fonctionnelles et comportementales est précoce et peut se faire dans des délais beaucoup plus courts. De plus, les coûts sont moins élevés que l'établissement d'une lignée d'animaux transgéniques (Götz *et al.*, 2018).

I.2.5.3. Modèles de neurotoxicité aux métaux cas de l'aluminium

Des études menées par Walton (Walton, 2009a ; Walton, 2009b ; Walton, 2009c) ont montré comment de petites doses d'Al neurotoxiques peuvent s'accumuler en quantités suffisantes pour déclencher une maladie neurodégénérative chez les animaux en bonne santé sans prédispositions génétiques évidentes. Cela a été rapporté par une ingestion chronique d'Al chez le rat, en quantités équivalentes à celles ingérées régulièrement par l'Homme. Les rats présentaient les caractéristiques neuropathologiques de la MA et s'accompagnant par une détérioration cognitive, une détérioration de l'hippocampe, une augmentation de l'expression d'APP et d'une teneur plus élevée d'Al dans les cellules.

I.3. Vers une approche nutritionnelle préventive du vieillissement pathologique

I.3.1. Contexte

Au cours des dernières décennies, les tentatives d'élaboration de nouvelles options thérapeutiques à l'égard de la MA se sont traduites presque toutes par des échecs. Les lésions caractéristiques de la MA commencent à se développer plusieurs années avant l'apparition des symptômes cognitifs et du diagnostic (Bateman *et al.*, 2012). Enfin, le diagnostic définitif de la MA ne peut se faire que *post-mortem*, par la mise en évidence des lésions (Karran *et al.*, 2011). La considération de tous ces éléments incite grandement à envisager la définition d'une stratégie de prévention de la MA (Viña et Sanz-Ros, 2018) (Figure 16). En effet, un régime déséquilibré est un facteur de risque de développer la MA (Armstrong, 2019). La surconsommation de régimes riches en sucres et en graisses altère les processus de mémoire et d'apprentissage et contribue au déclin cognitif (Hsu et Kanoski, 2014). Des mécanismes communs aux perturbations induites par la consommation de ces régimes et à celles présentes dans la MA ont été observés, et impliquent notamment une altération de l'intégrité de la BHE (Hsu et Kanoski, 2014). De plus, un régime riche en gras aggrave la pathologie de type Alzheimer chez la souris 3xTg-AD (Vandal *et al.*, 2014).

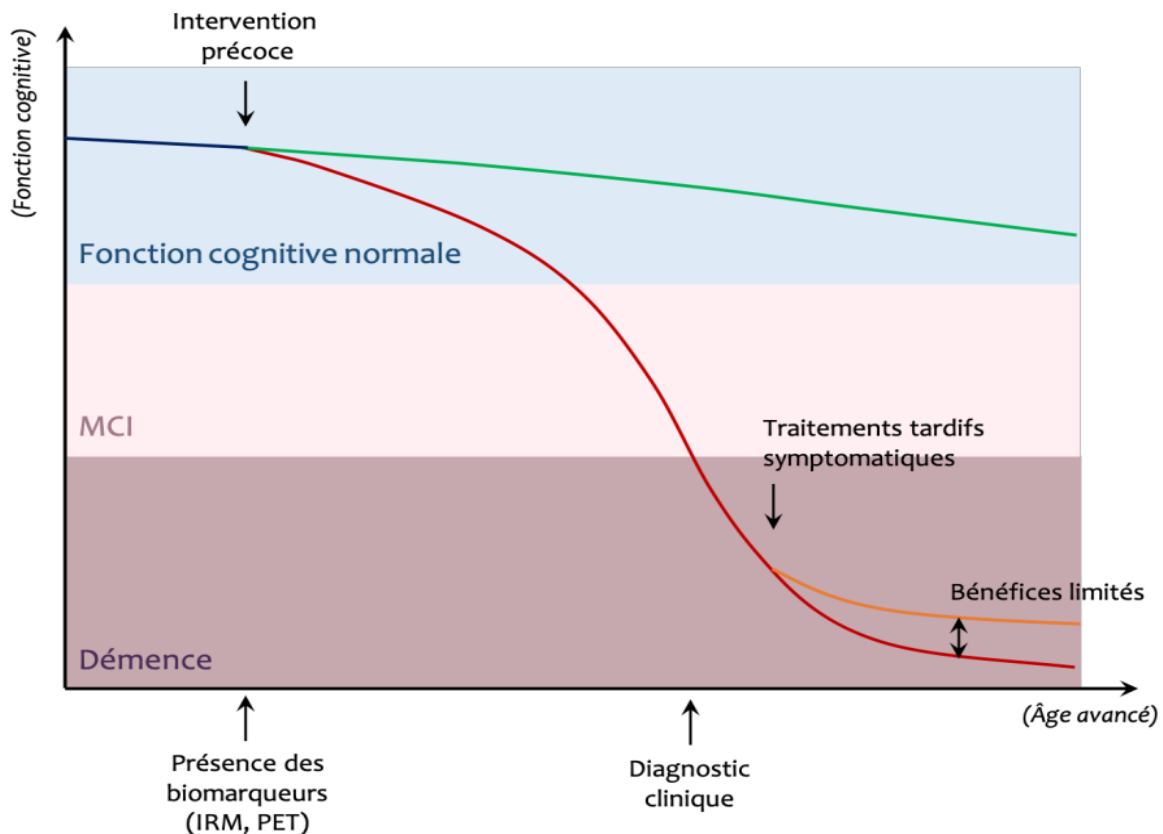


Figure 16 : Schéma représentatif du moment le plus approprié (hypothétiquement) pour prévenir la maladie d'Alzheimer (Viña et Sanz-Ros, 2018)

La courbe rouge représente la progression caractéristique du déclin cognitif observé dans la MA et la courbe verte celle d'un déclin cognitif normal avec l'aide d'une intervention préventive adaptée. Le point de divergence de ces deux courbes serait le meilleur moment pour entreprendre une stratégie préventive. La courbe orange indique la faible efficacité des traitements actuels de la MA en raison du moment où ils interviennent, et de leurs effets seulement symptomatiques.

À l'inverse, certains types de régimes, comme le régime méditerranéen ou le régime DASH (*Dietary Approaches to Stop Hypertension*), seraient associés à la préservation des capacités mentales et à un moindre risque de développer la MA notamment (Dominguez *et* Barbagallo, 2018; Cremonini *et al.*, 2019). Chez le rongeur, beaucoup d'études ont également démontré les effets bénéfiques d'approches nutritionnelles sur des modèles de vieillissement ou de démence (Wahl *et al.*, 2017). L'étude FINGER (*Finnish Geriatric Intervention Study to Prevent Cognitive Impairment and Disability*), menée en Finlande chez 1260 sujets âgés entre 60 et 77 ans, a consisté à apporter pendant deux ans, un coaching régulier aux sujets concernant différents aspects de leur vie quotidienne, y compris l'alimentation. Une plus grande

amélioration des performances cognitives a été observée chez les sujets ayant reçu le coaching comparativement à ceux qui ont eu un suivi classique (Ngandu *et al.*, 2015).

De plus, une revue systématique datant de 2013 a exploré l'effet prometteur qu'un apport en antioxydants pourrait avoir sur les fonctions cognitives. Les nutriments les plus examinés étaient la vitamine C, la vitamine E et le bêta carotène. Les flavonoïdes contenus dans le vin, le thé et le chocolat ont également été examinés. Une des études retenues démontre que les participants ayant consommés ces aliments auraient une prévalence plus faible d'avoir une cognition altérée (Shah, 2013). Une dernière revue systématique conclut qu'il serait intéressant d'élucider les différents mécanismes que chaque nutriment aurait sur le cerveau, notamment dans le but de développer de meilleurs agents thérapeutiques (Otaegui-Arrazola *et al.*, 2014).

I.3.2. Les polyphénols, des molécules naturelles d'intérêt thérapeutique

I.3.2.1. Définitions

Les polyphénols constituent une famille de molécules phénoliques très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Ce sont des métabolites secondaires essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement. Abondamment retrouvés dans le règne végétal comme produit du métabolisme secondaire des plantes, les polyphénols sont des composés organiques caractérisés par plusieurs groupements phénoliques de poids moléculaire variant entre 500 et 4 000 Dalton. Plus de 8 000 différents composés ont été décrits et divisés en 5 classes selon leur structure chimique. Ils correspondent aux substances actives de plusieurs plantes médicinales (Sawadogo *et al.*, 2012). La plupart des molécules phénoliques sont formées à partir de deux acides aminés aromatiques, la tyrosine et la phénylalanine. Leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon l'espèce, l'organe, le tissu ou le stade de développement. Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples, comme les acides phénoliques, vers les plus hautement polymérisées comme les tanins condensés. Avec plus de 8.000 structures phénoliques identifiées, les polyphénols sont répartis de façon ubiquitaire dans les fruits et légumes qui en constituent les principales sources alimentaires. Leurs concentrations sont particulièrement élevées dans certains produits ou extraits comme les huiles, le vin, le thé ou les jus, avec de fortes variations selon les espèces végétales utilisées. Retrouvés comme micronutriments abondants dans l'alimentation, les polyphénols sont reconnus pour leurs effets d'antioxydants naturels et leur rôle dans la prévention des maladies associées au stress oxydatif. Leurs effets préventifs et leur potentiel

thérapeutique dans le traitement du cancer et des maladies neurodégénératives, cardiovasculaires et inflammatoires émergent alors de manière évidente (Fraga et *al.*, 2019).

I.3.2.2. Structure et classification

Les polyphénols peuvent être regroupés en de nombreuses classes suivant la complexité du squelette de base (noyaux en C6), le degré de modification de ce squelette (oxydation, hydroxylation,...) et les molécules auxquelles ils sont associés (glucides, lipides, protéines ou autres métabolites). Les formes les plus simples sont représentées par deux principaux groupes dont dérivent de nombreux composés : les non flavonoïdes (acides phénoliques) et les flavonoïdes (Figure 17). Les formes complexes, comprenant entre autres les tannins et les lignines, sont quant à elles pour la plupart issues de la condensation de certaines formes simples.

➤ **Les non flavonoïdes (acides phénoliques)**

Deux classes peuvent être distinguées parmi les non flavonoïdes selon qu'ils dérivent de l'acide benzoïque (acides hydroxybenzoïques) ou de l'acide cinnamique (acides hydroxycinnamiques).

▪ **Les acides hydroxybenzoïques**

Présents dans peu de végétaux de l'alimentation courante, ils sont peu étudiés. Ils ont une formule de base de type C6-C1 (Figure 18a). Dérivés de l'acide benzoïque, leur diversité structurale est due aux méthyloxylation et/ou hydroxylation du noyau aromatique en diverses positions (1, 2, 3 et 4), donnant ainsi les acides 4-hydroxybenzoïque, 3-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicylique et gentisique (Tomás-Barberán et Clifford, 2000). Ils sont le plus fréquemment présents dans les fruits et légumes sous forme de conjugués (esters ou glycosides).

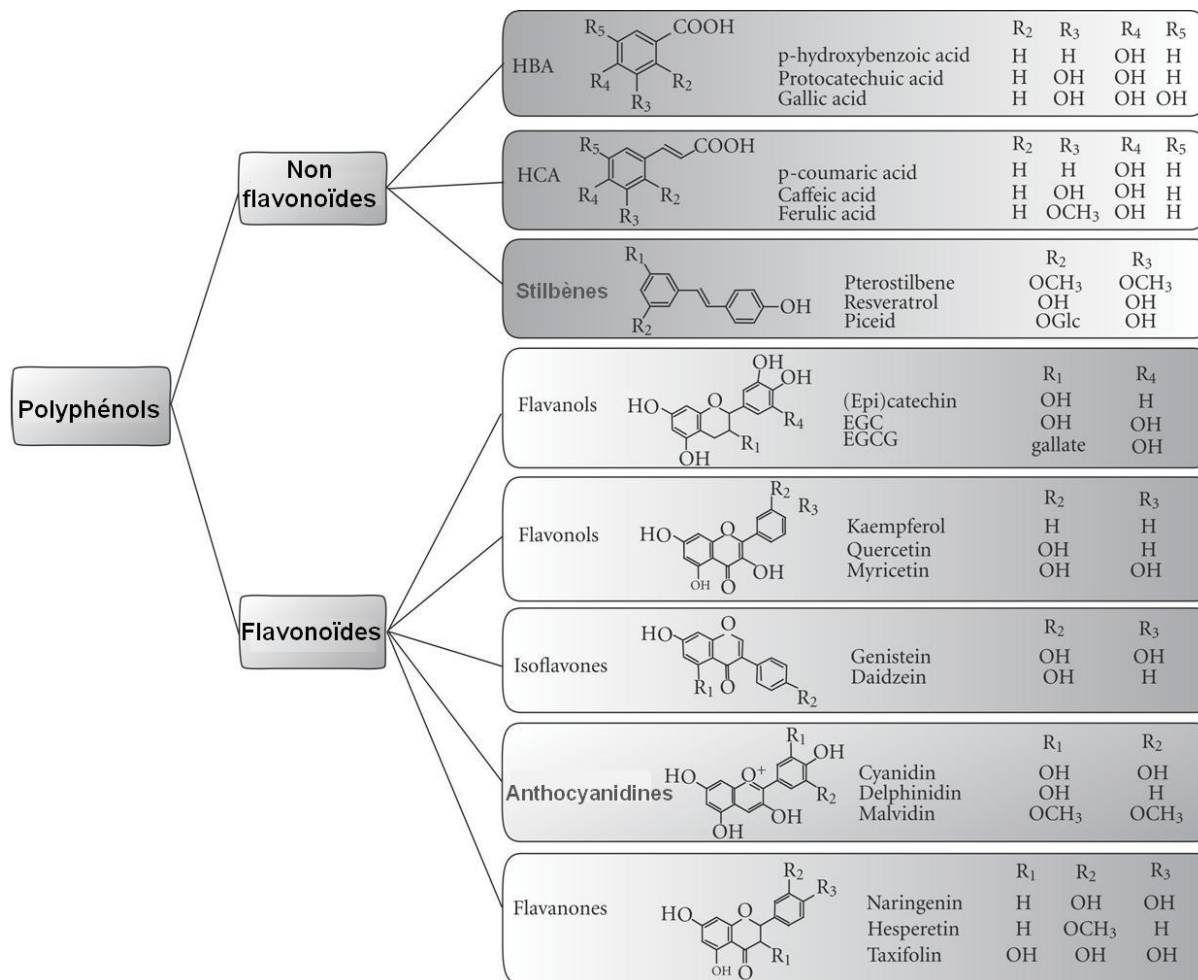
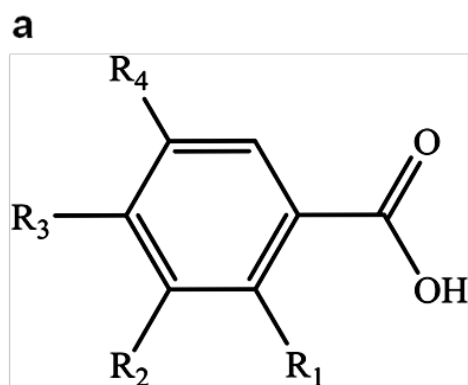


Figure 17 : Classification des polyphénols (Vauzour, 2012).

HBA : acides hydroxybenzoïques, *HCA* : acides hydroxycinnamiques



Composés	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ac. benzoïque	H	H	H	H
Ac. salicylique	OH	H	H	H
Ac. p-hydroxy-benzoïque	H	H	OH	H
Ac. gallique	H	OH	OH	OH
Ac. protocatéchuïc	H	OH	OH	H
Ac. vanillique	H	OCH ₃	OH	H

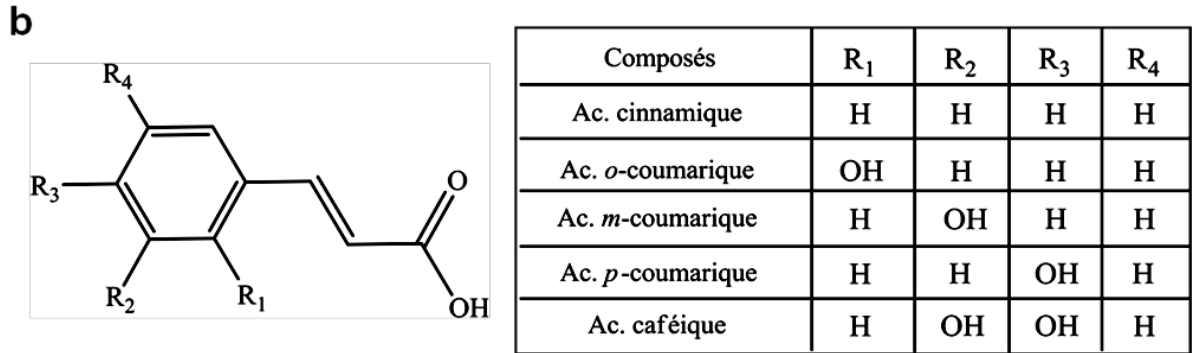


Figure 18 : Principales classes de l'acide phénolique

Formule générale et dérivés de l'acide benzoïque (a) ou de l'acide cinnamique (b)

▪ **Les acides hydroxycinnamiques**

Très répandus dans le règne végétal, ces composés ont une formule de base de type C6-C3 (Figure 18b) et leur diversité est également due à la variabilité des hydroxylations du noyau aromatique. Le composé le plus courant est l'acide caféique qui représente à lui seul 75 à 100% des acides hydroxycinnamiques totaux de la plupart des fruits. Les acides férulique, sinapique et 4-coumarique sont également répandus dans les aliments. Les acides hydroxycinnamiques sont rarement présents sous forme libre et sont retrouvés essentiellement sous formes conjuguées. Il s'agit de dérivés glycosylés ou d'esters avec les acides quinique, tartrique ou shikimique (Manach *et al.*, 2004).

➤ **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus abondants de notre alimentation et plus de 4.000 composés ont pu être identifiés (D'Archivio *et al.*, 2007). On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes. Par définition, les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure C6-C3-C6 du diphenylpropane (Figure 19). Les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C (de Rijke *et al.*, 2006). Les flavonoïdes sont subdivisés en six grandes sous-classes selon la structure de l'hétérocycle C : flavones, isoflavones, flavonols, flavanones, flavanols et anthocyanes. On trouve aussi des composés plus minoritaires, les chalcones et dihydrochalcones (Crozier *et al.*, 2009). Il existe dans chaque sous-classe de nombreux composés selon les substitutions des cycles aromatiques. La plupart des flavonoïdes sont glycosylés, ce qui augmente leur solubilité dans l'eau (Crozier *et al.*, 2009).

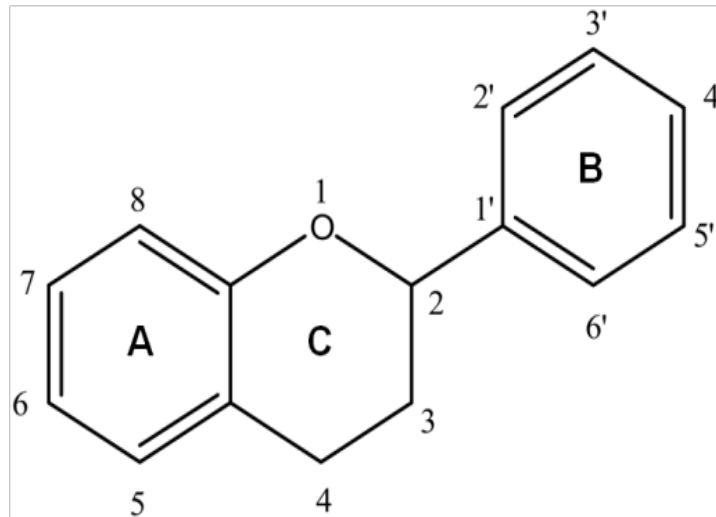


Figure 19 : Structure générale des flavonoïdes

I.3.2.2. Biodisponibilité

Les effets bénéfiques des polyphénols dépendent essentiellement de leur biodisponibilité, c'est-à-dire des étapes d'absorption, de métabolisation, de stockage et d'excrétion de ce composé (Figure 20). Il est important de savoir que les polyphénols, largement répandus dans l'alimentation humaine, ne sont pas nécessairement les plus actifs dans l'organisme, soit parce qu'ils ont une faible activité intrinsèque ou parce qu'ils sont mal absorbés, rapidement éliminés ou efficacement biotransformés. D'ailleurs, les métabolites résultant de la digestion ou de l'activité hépatique et qui sont retrouvés dans le sang et les organes cibles peuvent être porteurs d'activités biologiques différentes de celles des substances natives. Une connaissance approfondie des paramètres sur lesquels repose la biodisponibilité des polyphénols est donc essentielle pour élucider leurs effets sur la santé.

Les formes libres, ou aglycones, peuvent être directement absorbées au niveau de l'intestin grêle, alors que les formes glycosylées doivent être hydrolysées par des glycosidases de la flore intestinale au niveau du côlon avant d'être absorbées. Considérant la forte capacité de conjugaison des polyphénols au niveau intestinal et hépatique, les aglycones sont le plus souvent absents dans le plasma après consommation de polyphénols à doses nutritionnelles (Manach *et al.*, 2004). Les polyphénols glycosylés ou estérifiés natifs ne sont en général pas retrouvés non plus dans le sang. Les seuls produits identifiés sont les métabolites sulfatés, glucuronidés et/ou méthylés issus du métabolisme intestinal et hépatique, les glucuronides constituant les principales formes circulantes (D'Archivio *et al.*, 2010).

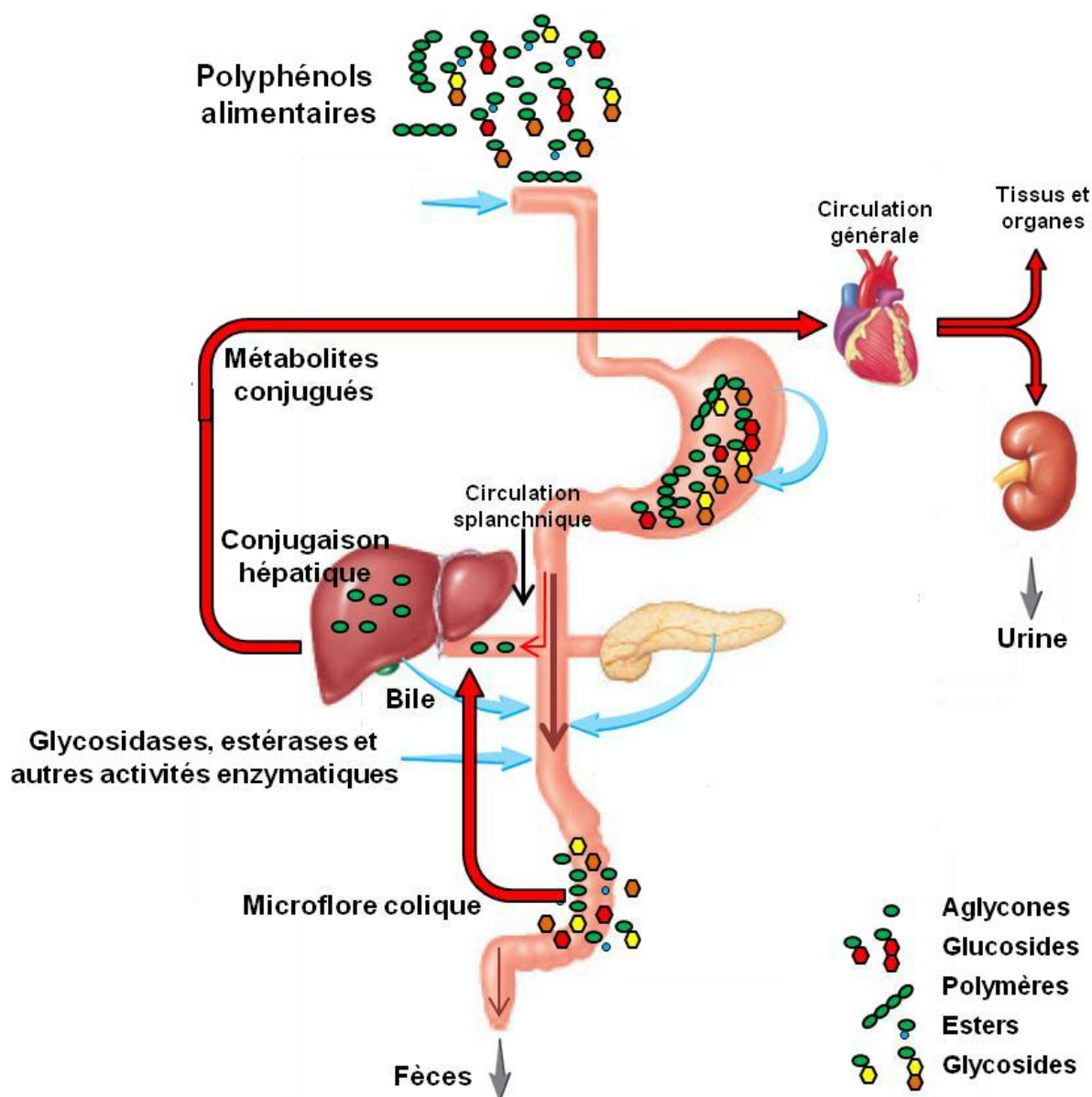


Figure 20 : Schéma général du métabolisme des polyphénols

Dans le plasma, les métabolites des polyphénols sont liés aux protéines plasmatiques et en particulier à l'albumine. Le degré de liaison à l'albumine a un impact sur la clairance des métabolites ainsi que sur leur délivrance aux cellules et tissus (Manach *et al.*, 2004). Malgré l'augmentation de l'hydrophilie due à la liaison à l'albumine, les polyphénols interagissent avec la membrane plasmique par des liaisons hydrogènes contractées à pH physiologique entre les groupements hydroxyles de la molécule et les têtes polaires des phospholipides (Verstraeten *et al.*, 2003). Ainsi, il semblerait que les polyphénols conservent, malgré leur liaison à l'albumine, leur capacité de liaison aux cellules.

Les concentrations plasmatiques des polyphénols varient en fonction de la nature des molécules consommées et des aliments sources consommés. Les polyphénols ingérés peuvent

pénétrer dans les tissus et organes, en particulier au niveau des lieux de métabolisation comme l'intestin et le foie. Toutefois, les polyphénols ont également été détectés dans des organes tels que le cerveau, le cœur, les reins, le thymus, le pancréas ou la prostate. Les concentrations en polyphénols dans ces organes étaient de 30 à 3000 ng d'équivalents aglycones/g de tissu selon le polyphénol considéré, la dose ingérée et l'organe analysé (Manach *et al.*, 2004). De plus, une sélectivité régionale a aussi été observée dans le cerveau (Datla *et al.*, 2001), avec une distribution hétérogène de la tangéritine, 10 fois plus élevée dans l'hypothalamus, l'hippocampe et le striatum que dans le tronc cérébral et le cervelet. Les polyphénols sont principalement excrétés par les voies biliaire et urinaire. L'implication de chacune de ces voies dépend principalement de la structure des molécules (Crespy *et al.*, 2003).

I.3.2.3. Propriétés biologiques

➤ Propriétés antioxydantes

La capacité antiradicalaire des polyphénols, plus particulièrement les flavonoïdes, a fait l'objet de nombreuses études récentes dans le domaine des thérapies antioxydantes, pour compenser l'insuffisance des systèmes endogènes et réguler l'équilibre rédox dans certains désordres comme le vieillissement pathologique. L'activité antioxydante des polyphénols peut s'exprimer sous plusieurs formes des radicaux libres. Ils peuvent ainsi intervenir en captant directement ces radicaux, en chélatant les cations métalliques, en inhibant les enzymes responsables de la génération des ROS, ou en protégeant des systèmes de défense antioxydants (Moussa *et al.*, 2017).

➤ Propriétés anti-inflammatoires

Les polyphénols possèdent aussi des propriétés anti-inflammatoires remarquables. Plusieurs études ont en effet mis en évidence l'action de ces composés et de leurs métabolites comme modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation. L'effet protecteur des polyphénols au niveau cérébral impliquerait divers effets comme la capacité d'activer la signalisation synaptique, stimuler le flux sanguin (Williams et Spencer, 2012) et la protection des neurones contre les atteintes des neurotoxines et de la neuroinflammation, caractérisée par l'activation des cellules gliales et la libération accrue de facteurs inflammatoires (Vauzour, 2012). Il est actuellement bien admis que les polyphénols exercent leur activité anti-inflammatoire en agissant sur la voie de signalisation des kinases et l'activation du facteur de transcription proinflammatoire (Moussa *et al.*, 2017).

➤ **Propriétés anti-apoptotiques**

Les polyphénols peuvent moduler des cascades de signalisation cellulaire régulant la survie cellulaire (Samy *et al.*, 2016).

➤ **Propriétés anti-amyloïdes**

La génération du peptide A β par clivage de la protéine APP au site β représente l'un des facteurs déterminants des phases précoces de la MA. Par leur capacité d'inhiber l'enzyme BACE1 responsable de ce clivage, différents polyphénols présentent un intérêt préventif évident dans ce contexte (Zheng *et al.*, 2017).

➤ **Propriétés neuroprotectrices**

Les propriétés neuroprotectrices des polyphénols ont été rapportées *in vitro*, *in vivo* et chez l'homme. En effet des études ont montré que les polyphénols protègent les neurones hippocampiques contre la mort neuronale et les altérations morphologiques induites par le peptide A β ou les neurotoxiques (Wobst *et al.*, 2015 ; Colizzi, 2019). Plusieurs études épidémiologiques d'observation ont évalué l'effet d'un régime riche en polyphénols sur le déclin cognitif ou la démence (Rajaram *et al.*, 2019 ; Yang *et al.*, 2021)

➤ **Propriétés neurotrophiques**

Les seules propriétés antioxydantes, qui ont longtemps été considérées comme étant le principal mode d'action expliquant les effets protecteurs de ces composés, semblent insuffisantes pour expliquer les effets bénéfiques des polyphénols au niveau cérébral, d'autant que la concentration de ces composés retrouvés à ce niveau est relativement faible par rapport à celle de vitamines comme l'acide ascorbique ou l' α -tocophérol (Spencer, 2008). Les flavonoïdes ont été montrés capables de traverser la barrière hémato-encéphalique *in vivo*, mais cette capacité semble nettement influencée par la lipophilie et les interactions avec des transporteurs (Youdim *et al.*, 2004). Les polyphénols semblent pouvoir agir en protégeant les neurones vulnérables, en stimulant le fonctionnement neuronal et le flux sanguin, ainsi qu'en favorisant la neurogenèse (Vauzour, 2012 ; Williams et Spencer, 2012). En effet, les polyphénols et leurs métabolites pourraient se fixer à différents récepteurs cellulaires comme les récepteurs δ -opioïdes, TrkB, du GABA de la nicotine, des estrogènes et de la testostérone. Une fois liés à leurs récepteurs, ces composés modifient l'activation des kinases, y compris les voies MAPK, PI3 et NF- κ B, ce qui pourrait moduler la plasticité neuronale et stimuler la synthèse de nouvelles protéines synaptiques (Vauzour, 2012 ; Williams et Spencer, 2012). Des données récentes suggèrent aussi une implication des polyphénols dans les processus de

neurogenèse. Ce phénomène diminue progressivement avec l'âge, ce qui peut favoriser l'apparition des troubles de mémoire et de cognition (Brickman *et al.*, 2014, Yang *et al.*, 2021).

I.3.3. Les triterpènes

Les triterpènes sont un groupe très diversifié de produits d'origine naturelle largement présent chez les plantes principalement au niveau de l'écorce de fruit ou de tige et la feuille (Vincken *et al.*, 2007). Au moins, 4000 composés triterpéniques avec des squelettes hydrocarbonés différents sont connus (Patocka, 2003). Ils existent souvent chez les plantes sous forme de saponines qui comprennent les aglycones, triterpènes hydrophobes appelés sapogénines et un ou plusieurs résidu(s) de sucre hydrophiles (Sawai et Saito, 2011). Les triterpènes (Figure 21) sont des dérivés du squalène. Ils sont issus de la cyclisation du 2,3 époxysqualène catalysée par l'oxydosqualène cyclase (Sawai et Saito, 2011).

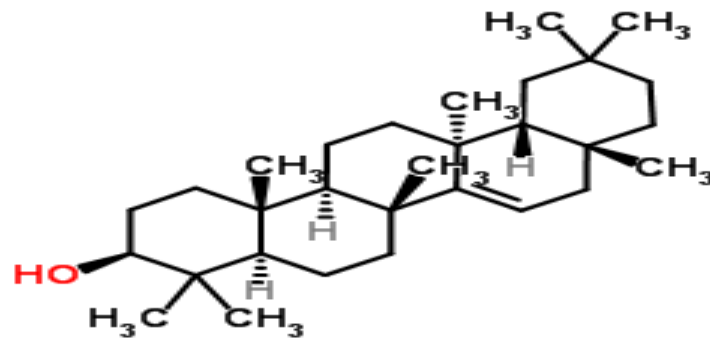


Figure 21 : Structure moléculaire d'un triterpène pentacyclique le taraxérol

Il a été montré que les triterpènes pentacyclique tels l'acide ursolique, l'acide oleanolique et l'acide betulinique ont un effet inhibiteur de l'enzyme ACAT (Liu *et al.*, 2017).

I.3.4. Les sapotacées : plantes riches en molécules neuroprotectrices

I.3.4.1. Description de la famille et quelques composés neuroprotecteurs isolés des plantes de cette famille

Les sapotacées (sapotaceae Juss., 1789) sont une famille de plantes à fleurs traditionnellement inclus dans l'ordre des ébenales. Cependant, les plus récentes études phylogénétiques les classent parmi les éricales et divisés en cinq tribus. Le nom vient du genre sapota (Mill. 1754). Cette famille se compose de 53 genres et environ 1250 espèces (Pennington, 1990). Ces espèces se composent d'arbres ou arbustes avec une large distribution dans le monde bien que la plus grande diversité se retrouve dans les régions tropicales et subtropicales, les régions d'Asie et d'Amérique du Sud (Swenson et Anderberg, 2005 ;

Govaerts et al., 2001). Plusieurs espèces de cette famille produisent des fruits comestibles, qui sont utilisés dans les régions tropicales pour l'alimentation humaine, bien que généralement en rôle secondaire. De plus, des graines de ces fruits, sont extraites des huiles denses souvent d'apparence de beurre. Le beurre de karité (*Vitellaria paradoxa*), l'huile arganier (arganier) en sont des exemples. Ces produits en particulier les beurres de karité sont largement utilisés dans l'industrie cosmétique (Pennington, 1990). Aussi, le latex de certaines espèces de manilkara, en particulier la chicle (*manilkara chicle*), est utilisé pour la production de chewing-gum. De nombreuses espèces de sapotacées fournissent également du bois et des ressources importantes pour la faune (olivera et al., 2010).

Les sapotacées sont également connues comme une famille de plantes très riches en composés bioactifs tels que les saponines, les flavonoïdes et les composés phénoliques. Plusieurs de ces composés ont été isolés des espèces de sapotacées (Tableau I).

Tableau I : quelques composés phénoliques isolés des espèces de sapotacées (Baky et al., 2016)

Acides phénoliques		Flavonoïdes	
Composés	Espèces	Composés	Espèces
Acide Caféique	- <i>Argania Spinosa</i> - <i>Manilkara zapota</i>	Myricétine-3-O-α- L- arabinopyranosid e	- <i>Pouteria torta</i> - <i>Pouteria campechiana</i>
Acide férulique	<i>Argania Spinosa</i>	Myricitine	<i>Argania Spinosa</i>
Acide gallique	- <i>Argania Spinosa</i> - <i>Manilkara zapota</i> - <i>Pouteria obovata</i> - <i>Pouteria sapota</i>	Quercétine	- <i>Argania Spinosa</i> - <i>Mimusops Manilkara</i> - <i>Vitellaria paradoxa</i>
Acide Syringique	- <i>Argania Spinosa</i> - <i>Synsepalum dulcificum Daniell</i>	Quercétine-3-O-α- L- rhamnopyranosid e	- <i>Argania Spinosa</i> - <i>Manilkara zapota</i> - <i>Mimusops manilkara</i> - <i>Pouteria campechiana</i>

I.3.4.2. Arganier plante de la famille des sapotacées ayant démontrée des activités neuroprotectrices

Argania spinosa ou l'arganier est un arbre oléagineux presque uniquement retrouvé au Maroc. C'est un arbre épineux d'où le nom d'espèce « *spinosa* ». De taille pouvant atteindre 8 à 10 m de hauteur selon les conditions écologiques, la cime est très grande et étalée, dense et à contours arrondis. L'huile d'argan est extraite à partir du fruit de l'arganier. Cette huile contient de nombreuses molécules bioactives (Khallouki et *al.*, 2003) (Tableau II).

Tableau II : Composition en molécules bioactives de l'huile d'argan (Khallouki et *al.*, 2003)

Tocophérols	Composés phénoliques	Phytostérols	Alcools triterpéniques
α -tocophérol	Acide Vanillique	Schotté nol	Lupéol
β -tocophérol	Acide Syringique	Spinastérol	Butyrospermol
γ -tocophérol	Acide Férulique	δ - 7 avénastérol	Birucallol
δ - tocophérol	Tyrosol	Campestérol	β -amyrine

Des études ont montré que l'huile d'argan est capable de s'opposer au stress oxydatif induit par le 7-cétocholestérol (7KC) sur des oligodendrocytes murins 158N et par le chlorure d'aluminium sur des rats Wistar (Badreddine et *al.*, 2017).

I.4. *Austranella congolensis* (sapotacée)

I.4.1. Description botanique

Austranella congolensis (« MUKULUNGU ») est un arbre dominant de la forêt dense humide d'Afrique Centrale, de la famille des Sapotacées. Au sein des sapotacées, *A. congolensis* appartient à la tribu des Mimosopeae (Aubreville, 1964). Cet essence fournit un bois de qualité et rappelle le moabi. En effet, les aires de distribution des deux espèces se chevauchent largement (Figure 22). Néanmoins, la repartition du Moabi au Cameroun (Faure, 1985) et son extrême rareté en République centrafricaine laissent supposer qu'il requiert un optimum écologique plus océanique. *Austranella congolensis*, très fréquent quant à lui dans certaines régions de la République Centrafricaine (Mbolo, 1991).

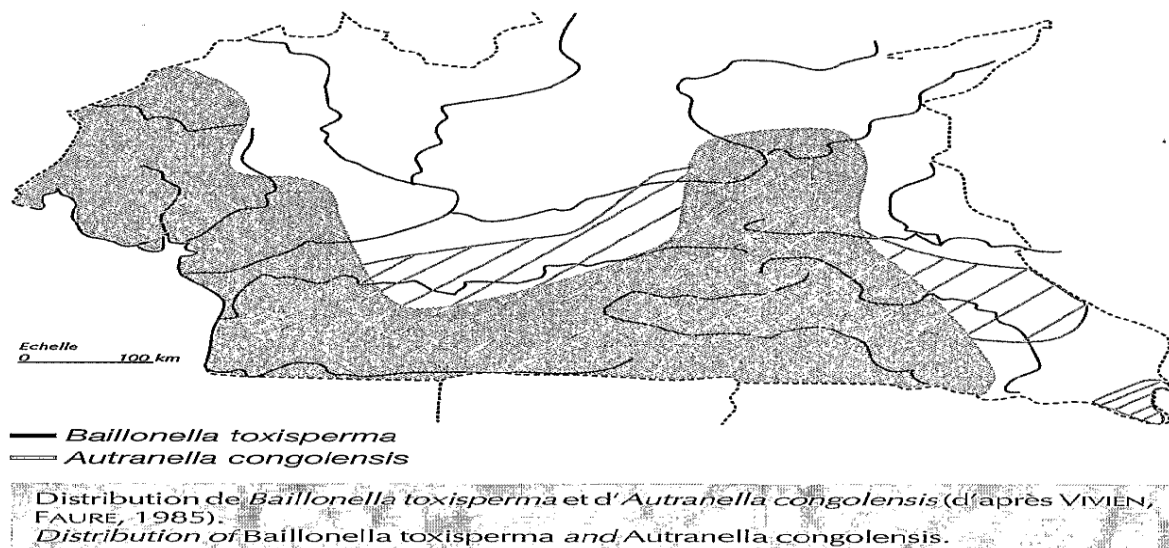


Figure 22 : Distribution de *Baillonella toxisperma* et *Autranella congolensis* (Faure, 1985).

Autranella congolensis est une essence des forêts primaires du type sempervirente (Figure 23) au fut droit, cylindrique, long sous branche de 20 à 30 mètre et pouvant atteindre 1,5 mètre de diamètre (Aubeville, 1964). Le fruit d'*A. congolensis* (Figure 33) est une baie ovoïde (diamètre : 5 cm, hauteur : 7 cm), vert jaunâtre à maturité, qui contient une seule graine (parfois 2 ou 3). L'épicarpe est mince, le mésocarpe est charnu et l'endocarpe membraneux enveloppe étroitement la graine. Celle-ci, de forme abovée, mesure 5 × 3 × 2 cm. L'écorce est brune, profondément crevassée longitudinalement (Figure 33).





Figure 23: *Autranella congolensis* : arbres, feuilles et écorces, fruits et graines

I.4.2. Usages

Cet arbre présente beaucoup d'usage à savoir :

- Le bois d'*Autranella congolensis* est utilisé en menuiserie, construction, traverses hydrauliques et en tranchage (Faure, 1985) ;
- L'écorce sèche pilée d'*A. congolensis* est appliquée sur les plaies, et utilisée pour le traitement de la diarrhée, la dysenterie chronique et le paludisme. Une décoction d'écorce est absorbée pour traiter la blennorragie, la syphilis, la dyspepsie, les coliques et les rhumes. Utilisée par voie externe pour traiter la fièvre, les douleurs, les maladies de la peau. Une macération de l'écorce est utilisée pour ses propriétés cardiotonique et hypotensive ;
- Les oreillés faits à base des fleurs sèches induisent la décharge nasale et soulage le mal de tête ;
- Les fruits ovales sont réputés comestibles. Une huile comestible est extraite des graines, et elle est employée pour la cuisine au Gabon (Wilks et Issembé, 2000).

I.4.3. Travaux antérieurs sur les écorces d'*Autranella congolensis*

Plusieurs composés ont été isolés des écorces d'*Autranella congolensis* :

- **Polyphénols** (acide 24-feruloyltetracosanoïque et (+)-catéchine) ;
- **Stérol** ((24R)-Stigmast-7,22(E)-dien-3- α -ol (chondrillasterol));
- **Triterpènes pentacycliques** (taraxérol 3-hexacosanoate, taraxérol 3-tetracosanoate, taraxérol 3-docosanoate, taraxérol et taraxérone) (Fokou, 2006).

Plusieurs travaux scientifiques ont été également réalisés sur ces écorces (Tableau III). Cependant aucune publication n'a été reportée sur des quelconques activités anticholinestérasique ou neuroprotectrice ou neurorégénératrice de cette plante.

Tableau III : Travaux antérieurs sur les écorces d'*Autranella congolensis*

Auteurs de l'études	Nature de l'extrait	Activité	Dose(s) testée(s)	Résultats
Assob et al., 2014	Méthanol	Screening de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	/	Activité antioxydante élevée
Njouendou et al., 2014	Méthanol	Toxicité aigue	2000 mg/kg PC	DL50>2000 mg/kg PC
Njouendou et al., 2014	Méthanol	Potentiel hépatoprotecteur (hépatotoxicité induite par la thioacétamide)	100 et 200 mg/kg PC	Activités antioxydante et hépatoprotectrice comparable à celle de la silymarine
Njouendou et al., 2018	Méthanol	Potentiel hépatoprotecteur (hépatotoxicité induite par le CCl4)	100 et 200 mg/kg PC	-Régénération des hépatocytes - Réduction de la peroxydation lipidique dans le foie - Augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT dans le foie - Augmentation des taux de GSH

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal était constitué d'écorces, feuilles et fruits d'*A. congolensis*. Ils ont été collectés le 23 juin 2016 à Oveng, Arrondissement de Ngoumou, Département de la Mefou et Akono, Région du Centre (Cameroun). L'identification de la plante a été effectuée à l'Herbier National par comparaison au spécimen N°39458HNC à Yaoundé Cameroun. Après nettoyage, les écorces de *A. congolensis* ont été séchées à l'air libre jusqu'à l'obtention d'un poids constant puis broyées dans un mixeur jusqu'à l'obtention d'une poudre.

II.1.2. Matériel animal

Les études ont été réalisées sur quarante-huit rats femelles de souche *Wistar* de poids compris entre 250-300 g et élevées dans l'animalerie du Laboratoire de Nutrition et Biochimie Nutritionnelle (Faculté de Sciences de l'Université de Yaoundé I).

Tableau IV: Composition de la diète

Nutriments	Ingrédients	Composition en %	Apport en Kcal
Source de protéines	Mais	6,525	26,1
	Poisson	0,68	2,72
	Son de blé	0,159	0,636
	Palmiste	0,61	2,44
	Soja	3,47	13,88
			45,776
Sources de lipides	Mais	2,9	26,1
	Poisson	0,12	1,08
	Son de blé	0,048	0,432
	Palmiste	5,53	49,77
	Soja	1,59	14,31
			91,692
Sources de glucides	Mais	45,603	182,412
	Soja	2,83	11,32
	Son de blé	0,232	0,928
	Palmiste	1,96	7,84
			202,5

Sources de sels	Sel, farine d'os	2	/
Sources de vit	Polyvitamines	0,5	/
Sources de fibres	Blé, maïs, soja, arachide,	8,7875	/
Valeur énergétique en Kcal/100g			339,968

Les animaux recevaient une diète dont sa composition figure dans le tableau IV ci-dessus et de l'eau potable. L'ensemble des expériences conduites sur ces animaux a été réalisé en accord avec les principes du *Guide to the Care and Use of Experimental Animals* (Canadian Council on Animal Care, 1993).

II.1.3. Matériel de laboratoire

II.1.3.1. Appareillage

- Balance sensible (OHAUS),
- Centrifugeuse (BIOHAZARD)
- Bain marie (BIOLine),
- Spectrophotomètre (BIOLine),
- Plaque chauffante (BIOLine),
- Incubateur (BIOHAZARD)
- Rotavapeur (BÜCHI)
- Vortex (BIOHAZARD)
- Spectromètre de masse LCQ (Finnigan MAT).

II.1.3.2. Réactifs

- Tampon citrate (100 mM, pH 4,5);
- NaCl (150 mM), NaCl (0,9 %);
- Tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,4);
- Tampon carbonate (0,05 M; pH 10,2);
- Adrénaline (0,3 mM);
- Acide trichloroacétique (TCA) 20% p/v;
- Acide thiobarbiturique (TBA) 0,375% p/v,
- HCl (1 N),
- Butylhydroxytoluène (BHT) 0,01% p/v,
- . Acide gallique
- Réactif de Folin ciocalteu (0,2N)

- Chlorure d'aluminium (AlCl_3) (10 %)
- Acétate de potassium (CH_3COOK) (1 M) ;
- Ethanol (95%) ;
- Acide chloridrique (HCl) (1 N) ;
- Vanilline (4 % P/V dans l'éthanol 95°) ;
- Acide sulfurique (H_2SO_4) (0,6M) ;
- Molybdate d'ammonium (4 mM) ;
- Phosphate de sodium (28 mM) ;
- Naphtyléthylène diamine dihydrochloride (0,1 %) ;
- Acide Thiobarbiturique(TBA) (0,375p/v) ;
- Butylhydroxytoluène(BHT) (0,01p/v) ;
- -Acide trichloro acétique (TCA) (20%p/v) ;
- HCl (2,5 N) ;
- 2,4-Dinitrophénylhydrazine (DNPH) (10 mM dans du HCl 2,5 N) ;
- Guanidine hydrochloride (6 M) ;
- Ethanol-éthylacétate (1v/1v) ;
- DTNB ;
- Tampon tris- HCl (0,1 M ; pH 6,5) ;
- Adrénaline (0,3 mM) ;
- Peroxyde d'hydrogène (50 mM) ;
- Solution de dichromate ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)/acide-acétique : mélange 1v/3v de dichromate de potassium 5% avec de l'acide acétique concentré;
- Tampon phosphate (50 mM ; pH 7,4) ;
- GSH (0,1 mM) ;
- Peroxyde d'hydrogène (0,1 mM) ;
- Acide trichloroacétique (TCA) (10 % p/v) ;
- Tampon Tris- HCl (100 mM ; pH 7,4) ;
- MnCl_2 (Chlorure de manganèse) (10 mM)
- Isocitrate de sodium (0,5 M) ;
- MnCl_2 (Chlorure de manganèse) (10 mM) ;
- Iodure d'acétylthiocholine (0,075 M) ;
- Kit (Sigma-Aldrich MAK022) ;
- Kit (Chronolab) ;
- Tampon HCl -Tris (30 mM ; pH 7.5) ;

- Histidine ;
- NaCl ;
- KCl ;
- MgCl₂ ;
- CaCl₂ ;
- EGTA ;
- Ouabaine ;
- Na-ATP ;
- TCA (10%)
- Kit Chronolab (cholestérol) ;
- Réactif d'iode (6 x 10⁻⁴ N d'iode dans une solution aqueuse de KI à 3%) ;
- Kit Chronolab (triglycérides) ;
- Kit sigma aldrich (glucose) ;
- Pyruvate (0,3 mM dans le tampon phosphate) ;
- NADH (8 mM).

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation des extraits de la plante

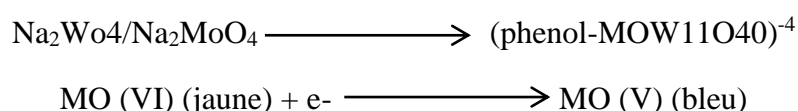
Deux cents grammes de poudre ont été extraites (deux extractions) avec de l'eau (2 x 1000 mL), de l'éthanol 95% (2 x 1000 mL) et du mélange eau-éthanol (v/v) (2 x 1000 mL) à température ambiante, pendant 48 heures. Les mélanges ont été agités deux fois par jour et les macérâts obtenus ont été filtrés sur papier filtre de type wattman N°1. Les filtrats obtenus ont été subséquemment évaporés sous vide à sec en utilisant un rotavapeur, à la température de 45-50°C. Ensuite, séchés dans une étuve à 50°C pour donner respectivement 16,42 g (extrait aqueux), 29,16 g (extrait éthanolique), et 37,7 g (extrait hydroéthanolique) d'extrait sec. Les extraits secs obtenus ont été conservés à 4°C pour les futures études.

II.2.2. Dosages des composés bioactifs d'intérêt

➤ Dosage des polyphénols totaux (Singleton et Rossi, 1965)

i) Principe

Cette méthode est basée sur la réduction du réactif d'acide phosphotungstique phosphomolybdique (Folin) en milieu alcalin et en présence des composés phénoliques pour former un complexe bleu-coloré dont l'absorbance est mesurée à 750 nm.



ii) Mode opératoire

Dans des tubes essai contenant un volume de 30 μL d'extrait (1 mg/mL) a été ajouté 1 mL de la solution de Folin (0,2 N). L'absorbance a été mesurée à 750 nm après 30 minutes de réaction. Les tests ont été effectués en triplicate.

iii) Expression des résultats

La teneur en polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage (Annexe 15) établie avec l'acide gallique (0-10-20-40-80 et 100 $\mu\text{g/mL}$) dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les teneurs en polyphénols totaux dans les extraits ont été exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/ g MS).

➤ Dosage des flavonoïdes totaux (Aiyegoro et Okoh, 2010).

i) Principe :

C'est une méthode colorimétrique, les flavonoïdes contenus dans l'échantillon réagissent avec le trichlorure d'aluminium et l'acétate de potassium pour former une solution de couleur rosâtre qui absorbe à 420 nm. L'intensité de coloration est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes contenue dans l'échantillon.

ii) Mode opératoire

Dans des tubes à essai contenant un volume de 1 mL d'extrait (1 mg/mL) ont été ajoutés 1 mL d' AlCl_3 , 1 mL de CH_3COOK et 5,6 mL d'eau distillée. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été lue à 420 nm contre le blanc. Les tests ont été effectués en triplicate.

iii) Expression des résultats

La teneur en flavonoïdes totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-10-20-40-80 et 100 $\mu\text{g/mL}$) dans les mêmes conditions que l'échantillon (Annexe 16). Les teneurs en flavonoïdes dans les extraits ont été exprimées en milligramme (mg) équivalent de quercétine par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EQ/g MS).

➤ Dosage des proanthocyanes (Sun et al.,1998)

i) Principe

Cette méthode est basée sur le fait que la condensation de la vanilline protonée forme des carbocations électrophiles en milieu acide avec les sites nucléophiles des composés phénoliques. Cette méthode est spécifique aux proanthocyanes et autres composés phénoliques qui ont une simple liaison en position 2,3 et possèdent des groupes méthahydroxyles sur le cycle B dont l'absorbance est lue à 500 nm.

ii) Mode opératoire

Dans des tubes à essai contenant les volumes de 3 mL de vanilline et 1,5 mL de HCl, a été ajouté 500 µL d'extrait (1 mg/mL). Après homogénéisation, la solution obtenue a été incubée à température ambiante pendant 15 minutes et l'absorbance mesurée à 500 nm contre le blanc. Les tests ont été effectués en triplicate.

iii) Expression des résultats

La teneur en proanthocyanes a été calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide cyanidique (0-10-20-40-80 et 100 µg/mL) dans les mêmes conditions que l'échantillon (Annexe 15). Les teneurs en proanthocyanes dans les extraits ont été exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide cyanidique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAC/g MS).

II.2.3. Mesure du potentiel antioxydant *in vitro* des extraits

II.2.3.1. Capacité antioxydante totale (C.A.T) (Prieto et al., 1999)

i) Principe :

Cette méthode est basée sur la réduction des molybdènes Mo (VI) présents sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} en molybdène Mo (V) MoO^{2+} en présence d'un antioxydant pour former un complexe vert (phosphate/ Mo(V)) à pH acide. L'intensité de coloration est mesurée à 695 nm et est proportionnelle à la quantité d'antioxydant présent dans le milieu réactionnel.

ii) Mode opératoire

Dans des tubes à hémolyse en verre contenant un volume de 0,3 mL d'extrait (1mg/mL) a été ajouté 3 mL de solution du réactif (0,6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium). Les tubes ont été vissés et incubés à 95°C pendant 70 minutes. Après refroidissement, l'absorbance des solutions a été mesurée à 695 nm contre le blanc. Les tests ont été effectués en triplicate.

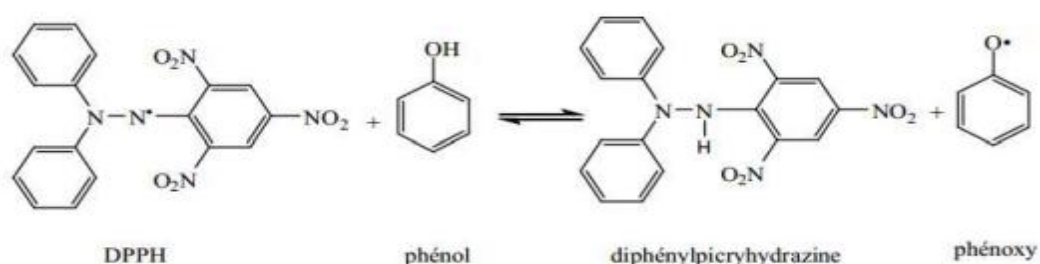
iii) Expression des résultats

La capacité antioxydante totale a été calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-25-50-75-100-150-250 $\mu\text{mol/mL}$) dans les mêmes conditions que l'échantillon. Elle a été exprimée en micromoles d'équivalents d'acide gallique par gramme de poids de la matière sèche ($\mu\text{mol EAG/ g MS}$).

II.2.3.2. Piégeage du radical 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) (Sanchez-Moreno, 1998)

i) Principe

Dans ce test, les antioxydants réduisent le radical diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH[•]) de couleur violette en un composé jaune, le diphenyl-picrylhydrazine (DPPH-H). L'intensité de coloration est mesurée à 517 nm et est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu réactionnel.



ii) Mode opératoire

Dans des tubes à hémolyse en plastique contenant un volume de 50 μL de différentes concentrations de chaque extrait (0-50-80-100-200-250-500 $\mu\text{g/mL}$) ou de quercétine (0-50-80-100-200-250-500 $\mu\text{g/mL}$) ou de témoin (éthanol) a été ajouté 1,950 mL de la solution éthanolique du DPPH fraîchement préparée (0,025 g/L). Le mélange a été incubé à l'abri de la lumière pendant 30 minutes, ensuite l'absorbance a été lue à 515 nm. Les tests ont été effectués en triplicate.

iii) Expression des résultats

L'activité anti-radicalaire DPPH[•] du standard (quercétine) et des différents extraits a été exprimée en pourcentage en utilisant l'équation ci-dessous :

$$\text{Pourcentage de piégeage (\%)} = \frac{\text{Absorbance (témoin)} - \text{Absorbance (essai)}}{\text{Absorbance(témoin)}} \times 100$$

La CP₅₀ (concentration de piégeage 50) est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour piéger 50% du radical DPPH. Cette concentration a été calculée graphiquement à partir de l'équation de la régression logarithmique issue de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait ou de standard.

II.2.3.3. Piégeage du radical oxyde nitrique (NO•) (Sreejayan et Rao, 1997)

i) Principe

Au cours de l'expérience, le radical NO• généré par le nitroprusside de sodium au pH physiologique interagit avec l'oxygène pour produire les ions nitrites qui seront mis en évidence par le réactif de Greiss. Plus l'extrait est actif, moins il y a production d'ions nitrites et plus faible est l'absorbance mesurée à 540 nm.

ii) Mode opératoire

Dans des tubes à hémolyse en plastique contenant un volume de 1 mL d'extrait (0-50-80-100-200-250-500 µg/mL) ont été ajoutés 2 mL de sodium nitroprusside. Le mélange a été homogénéisé et incubé à 25°C pendant 15 minutes. Après incubation, 0,5 mL du mélange réactionnel a été prélevé et mélangé à 1 mL d'acide sulfanilique. Après repos pendant 5 minutes pour diazotation complète, 1 mL de NED (réactif de Greiss) a été ajouté, et la solution homogénéisée et incubée à température ambiante pendant 30 minutes. Un chromophore rose se forme dès lors que la lumière diffuse. L'absorbance a été lue à 540 nm. Le témoin est constitué du mélange réactionnel sans nitroprusside. Le témoin a été préparé comme précédemment, mais en remplaçant l'extrait par la solution méthanolique (nitroprusside + solution méthanolique). Les tests ont été effectués en triplicate.

iii) Expression des résultats

L'activité anti-radical NO• du standard (quercétine) et des différents extraits a été exprimée en pourcentage en utilisant l'équation ci-dessous :

$$\text{Pourcentage de piégeage (\%)} = \frac{\text{Absorbance (témoin)} - \text{Absorbance (essai)}}{\text{Absorbance(témoin)}} \times 100$$

La CP₅₀ (concentration de l'échantillon testé nécessaire pour piéger 50% du radical NO•) a été calculée graphiquement à partir de l'équation de la régression logarithmique issue de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait ou de standard.

II.2.3.4. Capacité chélatrice des ions ferreux (Minotti et Aust, 1987)

i) Principe

L'activité de chélation de fer ferreux consiste à suivre l'inhibition de la formation d'un complexe coloré fer(II)-1,10 phénanthroline à 510 nm. En effet l'activité chélatrice du fer de l'extrait est mesurée par sa capacité à concurrencer avec la 1,10 phénanthroline pour la fixation des ions ferreux.

ii) Mode opératoire

Dans des tubes à hémolyse en plastique contenant un volume de 300 µL de FeSO₄ ont été ajoutés des volumes de 200 µL d'extrait (0-50-80-100-200-250-500 µg/mL) ou de quercétine (0-50-80-100-200-250-500 µg/mL) ou d'eau distillée (témoin), puis 336 µL de tampon phosphate et 436 µL de NaCl. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 5 minutes. Ensuite, un volume de 260 µL de 1,10 phénanthroline a été ajouté au mélange. L'absorbance a été lue à 510 nm. Les tests ont été effectués en triplicate.

iii) Expression des résultats

L'activité chélatrice du standard (quercétine) et des différents extraits a été exprimée en pourcentage en utilisant l'équation ci-dessous :

$$\text{Pourcentage de piégeage (\%)} = \frac{\text{Absorbance (témoin)} - \text{Absorbance (essai)}}{\text{Absorbance(témoin)}} \times 100$$

La CP₅₀ (concentration de l'échantillon testé nécessaire pour chélater 50% de fer ferreux) a été calculée graphiquement à partir de l'équation de la régression logarithmique issue de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait ou de standard.

II.2.4. Analyse phytochimique de l'extrait le plus actif par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (Moss et al., 2013 ; Teixeira et al., 2016).

i) Principe

La HPLC/SM est une méthode de chimie analytique couplant la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la spectrométrie de masse (SM). En effet la chromatographie en phase liquide (*Liquid Chromatography*, LC) est une technique analytique utilisée pour séparer, identifier et quantifier les différents composés présents dans un mélange

complexe. L'échantillon est entraîné par une phase mobile liquide à travers une colonne contenant une phase solide (phase stationnaire) qui va retenir de manière plus ou moins importante les composés en fonction des interactions physico-chimiques qui se créent avec ces phases. Les toutes premières méthodes de chromatographie reposaient sur un phénomène de gravitation pour le passage du liquide dans la colonne, ce qui demandait un temps de séparation important. Actuellement, la technique la plus employée est la chromatographie en phase liquide à haute performance (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) où la phase mobile est poussée par des pompes dans une colonne adaptée aux fortes pressions. Cette amélioration offre des temps de séparation beaucoup plus courts et la possibilité d'utiliser des quantités d'échantillons plus faibles. Les molécules sortant de la colonne sont ensuite directement introduites dans un spectromètre de masse qui apporte des informations sur leur rapport masse-sur-charge. Lors de l'analyse SM, les ions introduits sont séparés dans l'instrument en fonction de leur ratio masse-sur-nombre de charges (m/z) et détectés proportionnellement à leur abondance. Les données collectées sont présentées sous forme d'un spectre de masse, où l'abscisse est une échelle de m/z et l'ordonnée l'intensité relative. La combinaison de ces deux techniques offre un outil très apprécié dans l'identification de métabolites secondaires.

ii) Mode opératoire

Les analyses de l'extrait par HPLC/SM ont été réalisées dans les conditions chromatographiques décrites à l'Annexe (Annexe 1). Le système HPLC a été couplé à un spectromètre de masse LCQ (Finnigan MAT) à trappe ionique équipé d'une source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Les analyses ont été effectuées en mode positif. Les ions moléculaires protonnés $[M+H]^+$ ont été choisis comme ions parents pour la fragmentation.

II.2.5. Etude *in vivo* sur un modèle animal de neurotoxicité

II.2.5.1. Modèle expérimental (Adapté de Vandana *et al.*, 2014)

Les groupes expérimentaux ont été conçus de sorte à ce que, au début du traitement, les groupes soient homogènes au niveau du poids et de la glycémie. De cette façon les différences métaboliques observées après le traitement sont le reflet du traitement plutôt que de l'évolution des différences individuelles. Un lot constituait le groupe de rates témoin. Les groupes restants recevaient une dose unique de 50 mg/kg de poids corporel de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Une heure après, des doses d'extrait (150 ou 300 mg /Kg poids corporel) ou de vitamine E (sous forme d'acétate d'alpha tocophérol) (100 mg/kg poids corporel) ou de galantamine (2 mg/Kg

poids corporel) ou de l'eau distillée ont été administrées aux différents groupes expérimentaux (Tableau V). Les doses ont été administrées à l'aide d'une sonde gastro-œsophagique (volume d'administration était de 5 mL/kg de poids corporel) une fois par jour pendant 56 jours consécutifs. Le poids des animaux a été mesuré après chaque semaine aux mêmes heures à l'aide d'une balance.

Tableau V: Répartition des animaux et traitements

Groupes expérimentaux (8 rates /groupe)	Traitement
Groupe 1 (CN)	Rates recevant de l'eau distillée
Groupe 2 (CP)	Rates recevant 50 mg/kg d'AlCl ₃ + eau distillée
Groupe 3 (AC₁₅₀)	Rates recevant 50 mg/kg d'AlCl ₃ + 150 mg/kg PC/jour de l'extrait hydroéthanolique d' <i>A. congolensis</i>
Groupe 4 (AC₃₀₀)	Rates recevant 50 mg/kg d'AlCl ₃ + 300 mg/kg PC/jour de l'extrait hydroéthanolique <i>A. congolensis</i>
Groupe 5 (VE₁₀₀)	Rates recevant 50 mg/kg d'AlCl ₃ + 100 mg/kg PC/jour de vitamine E
Groupe 6 (GAL₂)	Rates recevant 50 mg/kg d'AlCl ₃ + 2 mg/kg PC/jour de galantamine

II.2.5.2. Etudes neuro-comportementales

Des études neuro-comportementales ont permis d'évaluer les fonctions cognitives et motrice des rates. La mémoire de reconnaissance à court et à long terme ainsi que la coordination motrice des rates ont été évaluées les semaines 4 et 7 des traitements. L'apprentissage et la mémoire spatiale des rates, les semaines 5 et 8. Plusieurs tests ont été utilisés.

II.2.5.2.1. Mémoire de reconnaissance à court et à long terme par le « Objet recognition test » (Ennaceur et Delacour, 1988 ; Fernandez *et al.*, 2008 ; Carlini, 2011)

i) Principe

Le test « objet recognition » (OR) repose sur l'affinité naturelle des rongeurs avec le nouvel objet. La reconnaissance de l'objet étant la capacité à percevoir les propriétés physiques d'un objet, à comprendre son utilisation, à se rappeler de ses utilisations antérieures.

ii) Dispositif du test (Annexe 2)

iii) Procédure de réalisation du test

Une heure après administration des différentes substances aux rates, chacune d'elles a été placée au centre du dispositif expérimental pour 5 minutes d'observation (Carter et Shieh, 2010) et à chaque passage le dispositif ainsi que les objets étaient nettoyés avec l'éthanol à 70%. La procédure d'évaluation de l'OR a été adaptée de celle décrite par Djiogué et collaborateurs en 2018 (Djiogué et *al.*, 2018). Suivant ce protocole, le test a été réalisé en trois (03) phases sur 03 jours d'affilés :

➤ **La phase d'habituation ou "pre-training"**

Au cours de cette phase, chaque rate était placée individuellement dans le dispositif de l'Open Field (OF) et était libre d'explorer le dispositif pendant 5 minutes. Cette étape était réalisée le jour 1.

➤ **La phase de familiarisation ou training**

Au cours de cette phase, deux objets identiques étaient présentés aux rates individuellement pendant une session de 5 minutes. Cette étape était effectuée le jour 2.

➤ **La phase d'essai ou test**

Au cours de cette phase, deux objets ont été présentés aux rates, l'un des objets ayant été utilisé lors de la phase de familiarisation et l'autre étant nouveau pour les rates (Figure 24). Ceci a été effectué d'une part le jour 2, 3 heures après l'étape de familiarisation pour la mémoire à court terme (Objets A+B) et d'autre part le jour 3, 24 heures après la familiarisation dans le but d'évaluer la mémoire à long terme (Objet A+C).

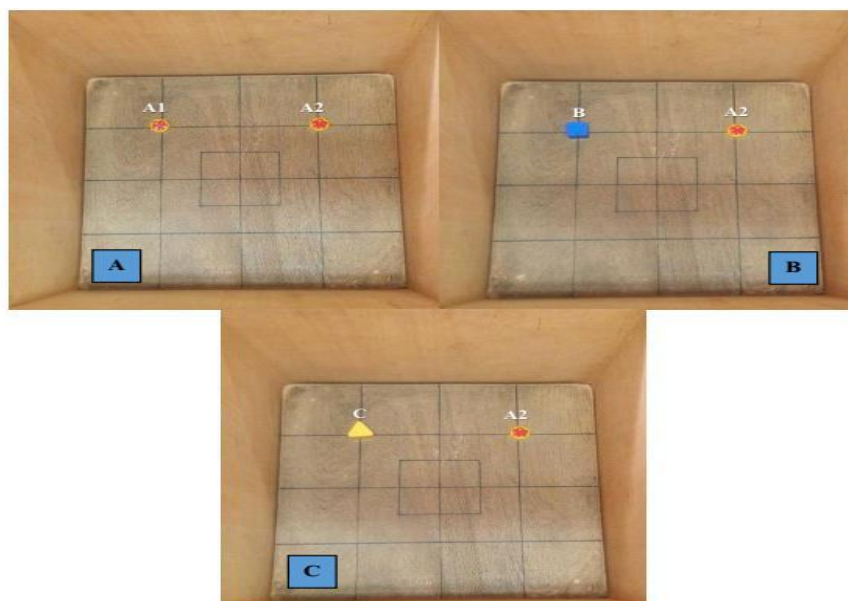


Figure 24 : Vue générale du protocole de réalisation de l'OR : *phase de familiarisation (A), phase test à court terme (B) et phase test à long terme (C)*. *A1 et A2 : objets identiques de la utilisés pour la familiarisation ; B : nouvel objet utilisé pour l'évaluation de la mémoire à court terme ; C : nouvel objet pour l'évaluation mémoire à long terme.*

Les rongeurs étant naturellement curieux, en présence d'un nouvel et d'un ancien objet, ils se rappellent de l'ancien objet et passent par conséquent plus de temps à explorer le nouvel objet (Carter et Shieh, 2010). Au cours de ce test, les paramètres suivants ont été évalués : le temps passé à explorer les objets A1 et A2 pendant la phase de familiarisation et le temps passé à explorer les objets A2 et B, et A2 et C pendant les phases de test. Le temps d'exploration était enregistré lorsque les rates touchaient l'objet, ou alors s'approchaient à moins de 2 cm de l'objet en question (Luine et al., 2003). Le dispositif ainsi que les objets ont été nettoyés à de l'éthanol à 70% après le passage de chaque animal. Les données étaient reportées sur des fiches de paramètres prévues à cet effet. Les données obtenues ont été exprimées en proportion de temps que l'animal passe sur le nouvel objet (Indice de Reconnaissance, IR) ; il varie entre 0 et 1 (Mogensen et al., 2002). Il a été déterminé selon la formule :

$$IR = \frac{TEN}{TEN + TEA}$$

TEN = temps d'exploration du nouvel objet

TEA= temps d'exploration de l'ancien objet

II.2.5.2.2. Mémoire spatiale par le test du « Morris Water Maze » (Morris et al., 1982)

i) Principe

Le test du « Morris water Maze » (MWM) a été conçu par Richard Morris au début des années 1980. Les rats sont d'excellents nageurs et ils doivent retrouver une plate-forme d'échappement pour éviter de se noyer. Ce test permet un apprentissage plus rapide par rapport à d'autres tests grâce à l'effet aversif de l'eau sur les rongeurs.

ii) Dispositif du test (Annexe 3)

iii) Procédure de réalisation du test du « Morris Water Maze »

La procédure de réalisation du test de MWM utilisée dans cette étude a été adaptée de celle de Li et collaborateurs (2012). Elle consistait en un entraînement de 4 jours et un essai de sonde au jour 5. Selon ce protocole, le test a été réalisé en (2) phases sur 5 jours : une phase d'entraînement de 4 jours et une phase test le jour 5.

➤ **Une phase d'entraînement**

Au cours de cette phase quatre quadrants (Nord, Sud, Est et Ouest) ont été pris en compte pour la piscine et la plate-forme a été fixée au centre du quadrant cible (Sud), tout au long des 4 jours d'entraînement. Une heure après administration des différentes substances aux rates, chacune d'elle a été relâchée dans l'eau à partir des points d'entrées distincts (Nord-sud, Est-Sud, Ouest-Sud) et avait 60 secondes pour trouver la plate forme cachée. À la fin des 60 secondes, si l'animal ne trouvait pas la plate-forme, il était guidé par l'expérimentateur jusqu'à celle-ci où il était autorisé à s'y reposer pendant 10 secondes. Ceci afin de mémoriser les indices spatiaux présents autour de la pièce. Trois essais étaient réalisés par jour, avec un temps de pause de 15 minutes entre les essais.

➤ **La phase test**

Cette phase a été réalisée le 5^{ème} jour afin d'évaluer la mémorisation spatiale. Elle consistait à savoir si l'animal trouvait la plate-forme par chance ou par mémoire véritable. Ainsi l'animal qui sait où se situait la plate-forme était censé là chercher à l'endroit où elle est supposée se trouver. Au cours de ce test la plate-forme a été retirée, après l'administration des différentes substances aux rates, chacune était relâchée dans l'eau dans l'un des quadrants fixes face au quadrant cible et avait 60 secondes de nage. Le temps nécessaire pour atteindre la position exacte de la plate-forme (TLPP), le temps passé dans le quadrant cible (TPCC) et le nombre de passage dans l'emplacement originel (NPEO) de la plate-forme ont été enregistrés via un système d'enregistrement de vidéo utilisant une caméra placée au-dessus de la piscine et reliée à un ordinateur.

II.2.5.2.3. Coordination motrice par le « Wire-Suspension Grip/Agility Test » (Crawley, 1999)

i) Principe

Ce test permet d'évaluer la force de traction, la coordination motrice et aussi mettre en évidence les éventuels effets sédatifs de substances pharmacologiques. Il consiste à suspendre des souris par les pattes antérieures à un fil métallique tendu horizontalement, et on compte le temps mis par la souris avant de lâcher le fil ou pour amener au moins une des pattes postérieures à toucher le fil.

ii) Dispositif du test (Annexe 4)

iii) Procédure de réalisation du test

Le test a été effectué une heure après administration des différentes substances. Chaque animal a été placé au centre du fil par un expérimentateur, puis lâché lorsqu'il a été accroché à l'aide de ces deux pattes antérieures. La durée du test a été fixée à 60 secondes et cette épreuve a été répétée trois fois pour chaque rate. La latence avant la chute de la corde a été enregistrée. Le score de 60 secondes a été attribué aux animaux qui ont réussi à se déplacer jusqu'aux barreaux de soutiens ou amener au moins une des pattes postérieures à toucher le fil avant la fin de la durée du test. Pour un même animal, l'épreuve suivante a été effectuée après 1 minute de repos et le temps moyen de latence de chacune des trois épreuves a été utilisé pour l'analyse statistique.

II.2.5.3. Sacrifice, prélèvement et préparation des tissus

II.2.5.3.1. Sacrifice et prélèvement des tissus

Le jour suivant la fin des expérimentations neuro-comportementales, les rates préalablement mises à jeûn (12 h) ont été décapitées et le sang a été récupéré dans des tubes contenant de l'EDTA (Terumo EDTA-K3, Terumo). Après avoir dépecé la tête de l'animal, et supprimé les muscles dorsaux qui recouvrent la portion occipitale de la calotte crânienne ainsi que la région cervicale dorsale, la calotte crânienne a été incisée par insertion de ciseaux fins au niveau de la moelle épinière. Les os de la voûte du crâne, cédant au niveau des sutures, ont été retirés à l'aide d'une pince. Puis, l'encéphale a été retiré délicatement de la boîte crânienne, les nerfs crâniens étant sectionnés au fur et à mesure. La boîte crânienne ouverte, les cerveaux ont été rapidement prélevés. Ils ont été lavés dans la solution de NaCl (0,9%), essorés, puis pesés et mis immédiatement dans de la glace. Parallèlement, les cerveaux de trois animaux de chaque groupe expérimental ont été immédiatement fixés dans une solution de formaldéhyde 10 % tamponnée et utilisés pour les études histopathologiques. Le corps des rates a été disséqué par la suite les organes tels que foie, les reins et cœur ont été prélevés et pesés. Les carcasses des rates ont été ensevelies.

II.2.5.3.2. Préparation des tissus

➤ **Plasma et Hémolysât**

▪ **Plasma**

Le sang collecté a été centrifugé à 1000 g pendant 10 minutes à 4°C. La phase supérieure contenant le plasma a été récupérée et congelée à -20°C jusqu'à utilisation.

▪ **Hémolysât**

Après centrifugation du sang total, un volume de 100 µL de culot a été introduit dans des tubes coniques. Le culot a été lavé dans 2 mL d'une solution de NaCl (0,9 %) et centrifugé à 900 g pendant 10 minutes, à température ambiante. Ce processus a été répété 2 fois. L'hémolyse des érythrocytes a été réalisée en ajoutant 2 mL d'eau distillée dans le culot. Les hémolysâts obtenus ont été aliquotés et conservés à -20 °C.

➤ **Préparation des échantillons de cerveau**

Une coupe sagittale du cerveau de rate a été réalisée. Chaque hémisphère droit a été utilisé pour la préparation des homogénats et l'autre hémisphère (gauche) pour l'extraction des lipides cérébraux.

▪ **Préparation des homogénats de cerveau**

Les tissus (hémisphère droit) ont été homogénéisés à 10 % (p/v) dans un tampon glacial contenant 50 mM Tris HCl, pH 7,4, 100 mM NaCl. Le mélange a été centrifugé à 1000 g pendant 10 minutes. La phase supérieure a été récupérée dans des tubes Eppendorf. Les concentrations en protéines totales ont été déterminées. Les homogénats ont été conservés à -20°C.

▪ **Extraction des lipides cérébraux (Folch et *al.*, 1951)**

i) Principe

Cette technique repose sur le principe d'une extraction à froid des lipides par un mélange de solvant méthanol/dichlorométhane (1/2 ; v/v). L'addition d'une solution aqueuse de chlorure de sodium permet la séparation des phases. La phase supérieure constituée de méthanol et d'eau contient les composés hydrophiles (glucides et protéines) dont la dissolution est favorisée par la présence de sel tandis que les lipides sont dissous dans la phase organique inférieure.

ii) Mode opératoire

Les extractions ont été effectuées en plaçant systématiquement les tubes contenant les échantillons dans de la glace et à l'abri de la lumière. Une masse de 0,5 g en moyenne de chaque hémisphère gauche des rates a été laissée à imbiber 10 minutes dans un tube placé dans de la glace contenant 3,3 mL de méthanol froid (4°C). L'ensemble a ensuite été homogénéisé pendant 5 minutes. Ensuite, un volume de 6,6 mL de dichlorométhane a été ajouté et l'ensemble homogénéisé 5 minutes encore puis filtré sur filtre Watman en microfibres de verre. Le filtrat a été transvasé dans un autre tube et un volume de 2 mL d'une solution de NaCl (0,9 %) a été ajouté. L'ensemble a été agité pendant quelques secondes puis centrifugé à 2000 g (+4°C)

pendant 5 minutes. La phase organique supérieure a ensuite été prélevée et les concentrations en protéines totales ont été déterminées. La phase organique inférieure restante contenant l'extrait lipidique a été conservé à -20°C dans des flacons hermétiques en verre ambré.

II.2.5.4. Analyses biochimiques

II.2.5.4.1. Dosage des marqueurs du stress oxydant

a) Dosage des marqueurs de la peroxydation lipidique et de l'oxydation des protéines

➤ Marqueurs de la peroxydation lipidique

- **Dosage des diènes conjugués (Esterbauer et *al.*,1989)**

i) Principe

Les produits primaires de l'oxydation des lipides contenant des doubles liaisons conjuguées peuvent être quantifiés par spectrométrie UV. En effet, l'oxydation des acides gras s'accompagne d'un déplacement des doubles liaisons qui passent de la position malonique à la position conjuguée. Les diènes conjugués absorbent à 232-244 nm et les triènes conjugués à 268 nm et peuvent donc être suivis par mesure de l'absorbance à ces longueurs d'ondes.

ii) Mode opératoire

Un mélange chloroforme/ méthanol (2v/1v) et NaCl 0,9% a été ajouté à 100 µL de plasma ou de culot érythrocytaire. Après 2 minutes d'agitation au vortex, une centrifugation a eu lieu à 1 000 g pendant 10 minutes. La phase chloroformique inférieure a alors été récupérée dans un tube à hémolyse en verre et vaporisée sous flux d'azote. De même, un volume de 100 µL d'extrait lipidique de cerveau a été introduit dans des tubes à hémolyse en verre puis vaporisés sous flux d'azote. Un volume de 1 mL d'hexane a été ajouté à chaque extrait sec et les densités optiques ont été lues à 243 nm.

iii) Expression des résultats

Les concentrations de diènes conjugués (DC) ont été calculées en utilisant la loi de Beer Lambert :

$$\text{Diènes conjugués } (\mu\text{M}) = \frac{DO}{\varepsilon \times l} \times 10^6$$

DO= densité optique de l'échantillon

ε = coefficient d'extinction moléculaire à 243 nm ($\varepsilon_{DC} = 2,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l= longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1 cm

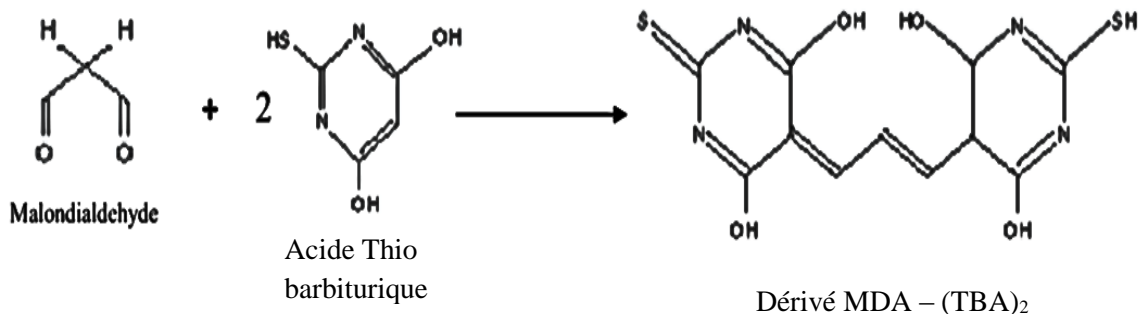
Les concentrations de diènes conjuguées (DC) ont été exprimées en $\mu\text{mol/L}$ dans le plasma et érythrocytes et en $\mu\text{mol/mg}$ de protéine dans le cerveau selon la formule :

$$\text{DC } (\mu\text{mol /mg de protéines}) = \frac{\text{DC}(\mu\frac{\text{mol}}{\text{L}})}{\text{protéines mg/L}}$$

▪ **Dosage du taux de malondialdéhyde (MDA) (Yagi, 1976)**

i) Principe

Les composés carbonylés à l'instar du malondialdéhyde (MDA) réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose absorbant à 532 nm.



ii) Mode opératoire

Cent microlitres (100 μL) d'échantillon et 900 μL de réactif TBA (Annexe 5) ont été introduits dans les tubes essais en verre et à vis puis fermés hermétiquement. Le mélange a été chauffé au bain-marie à 100 °C pendant 15 minutes puis refroidi dans un bain d'eau froide pendant 30 minutes. Les tubes ont été ensuite laissés ouverts pour permettre l'évacuation des gaz formés lors de la réaction. Puis, ils ont été centrifugés à 1000 g pendant 10 minutes et l'absorbance du surnageant a été lue à 532 nm.

iii) Expression des résultats

La concentration du MDA a été déterminée en utilisant la loi de Beer Lambert :

$$\text{MDA } (\mu\text{M}) = \frac{DO}{\epsilon \times l} \times 10^6$$

ϵ = coefficient d'extinction moléculaire ($\epsilon_{\text{MDA}} = 1,53 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l = longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1 cm

Les concentrations en malondialdéhyde (MDA) ont été exprimées en $\mu\text{mol/L}$ dans le plasma et érythrocytes et en $\mu\text{mol/mg}$ de protéine dans le cerveau tel décrit plus haut.

➤ **Dosage des marqueurs de l'oxydation des protéines (Oliver, 1987)**

▪ **Carbonyles protéiques**

i) Principe

La méthode est basée sur la réaction des groupements carbonyles des protéines avec le 2,4-Dinitrophénylhydrazine (DNPH). Il se forme le diphénylhydrazone qui absorbe à 380 nm.

ii) Mode opératoire

Des tubes à hémolyse en plastique contenant des volumes de 800 µL DNPH et 200 µL d'échantillon ont été incubés pendant une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. Une agitation a été effectuée toutes les 15 minutes durant le temps de l'incubation. Un volume de 1 mL de TCA a été ajouté, suivi d'une incubation du mélange dans la glace pendant 10 minutes. Ensuite, une centrifugation à 1800 g, pendant 5 minutes a eu lieu et le surnageant a été éliminé. Deux lavages du culot protéique ont été effectués avec le TCA et de l'éthanol-éthylacétate (1v/1v) suivi de centrifugations afin d'éliminer le DNPH. Le précipité final a été enfin dissout par ajout de 500 µL de guanidine hydrochloride et incubé à 37°C pendant 10 minutes. L'absorbance a été lue à 370 nm.

iii) Expression des résultats

Les concentrations en protéines carbonylées ont été calculées en utilisant la loi de Beer Lambert :

$$\text{carbonyls protéiques } (\mu\text{M}) = \frac{DO}{\varepsilon \times l} \times 10^6$$

ε = coefficient d'extinction moléculaire ($\varepsilon = 22\,000 \text{ M}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$)

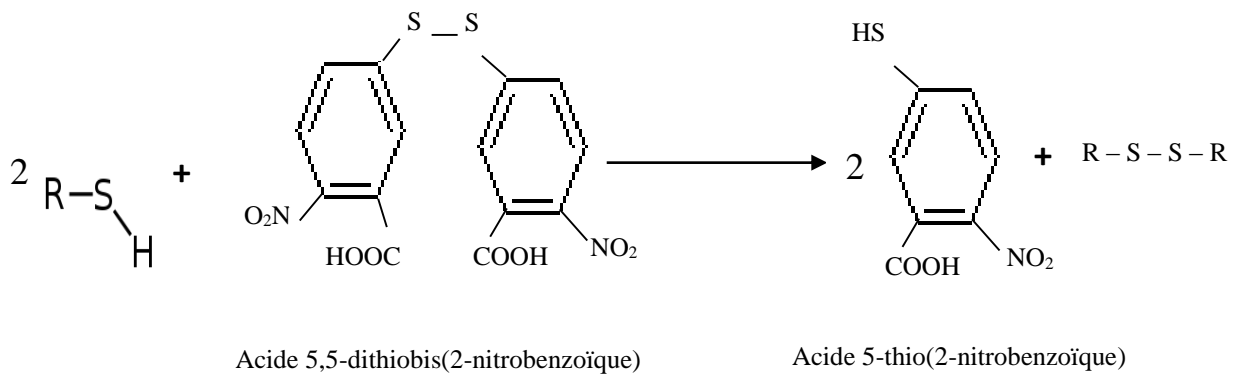
l = longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1 cm

Les concentrations en protéines carbonylées ont été exprimées en µmol/mg de protéine tel décrit plus haut

▪ **Thiols protéiques Ellman (1959)**

i) Principe

. Elle est basée sur la mesure des groupements thiols par le suivi de la concentration en TNB (acide 5- thio (2-nitro -benzoïque)) coloré en jaune, formé par réduction du DTNB (acide 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoïque)).



R = Radical protéique variable

ii) Mode opératoire

Des tubes à hémolyse en plastique contenant des volumes de 100 µL d'échantillon et 900 µL de réactif d'Ellman (Annexe 6) ont été homogénéisés et incubés à température ambiante pendant 30 minutes. Les densités optiques ont été lues à 412 nm.

iii) Expression des résultats

Les concentrations en thiols protéiques en µM ont été calculées en utilisant la loi de Beer Lambert :

$$\text{Thiols protéiques } (\mu\text{M}) = \frac{DO}{\epsilon \times l} \times 10^6$$

ϵ = coefficient d'extinction moléculaire du DTNB ($\epsilon_{\text{DTNB}} = 1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

l = longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1 cm

Les concentrations en thiols protéiques ont été exprimées en µmol/mg de protéine tel décrit plus haut.

b) Dosage des marqueurs enzymatiques de stress oxydatif

➤ Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (Misra et Fridovich, 1972)

i) Principe

La méthode est basée sur l'inhibition de l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome en présence de la SOD.

ii) Mode opératoire

Dans des tubes à hémolyse en plastique contenant un volume de 200 µL d'échantillon ont été ajoutés 2,5 mL de tampon carbonate de sodium. La réaction a été initiée par ajout de

300 µL d'adrénaline fraîchement préparée dans le tampon carbonate. Après homogénéisation, la variation de l'absorbance a été suivie dans une cuve à 480 nm et à 37°C pendant 150 secondes toutes les 30 secondes. La variation de la densité optique par minute a été mesurée. La cuve de référence contenait 2,5 mL de tampon ; 300 µL d'adrénaline et 200 µL d'eau distillée.

iii) Expression des résultats

L'activité spécifique de la SOD a été exprimée en Unité SOD.mg⁻¹ protéine. Une unité de SOD étant la quantité de SOD nécessaire pour entraîner 50 % d'inhibition de l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome pendant une minute.

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(\Delta DO_b - \Delta DO_e)}{\Delta DO_b} \times 100$$

ΔDO_b : variation absorbance du blanc en minute

ΔDO_e : variation de l'absorbance de l'échantillon en minute

50% d'inhibition= 1 unité

X% d'inhibition= Y unité

$$\text{SOD (unités/mg protéine)} = \left(\frac{\text{SOD unité/mL}}{\text{concentration proteine } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)} \right) \times \text{facteur de dilution}$$

➤ Dosage de l'activité de la catalase (Sinha, 1972)

i) Principe

Cette méthode est basée sur l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène sous l'action de la catalase présente dans l'échantillon. Le peroxyde d'hydrogène restant après action de la catalase se lie au dichromate de potassium en présence d'acide acétique pour former un précipité bleu vert d'acide perchlorique instable. Ce dernier va ensuite être décomposé par la chaleur et formé un complexe vert qui absorbe à 620 nm.

ii) Mode opératoire

Le mélange réactionnel était constitué de 50 µL d'échantillon auxquels ont été ajoutés 750 µL de tampon phosphate et 200 µL de peroxyde d'hydrogène. La réaction a été stoppée 60 secondes après, par ajout de 2 mL de la solution de dichromate/acide-acétique. Les tubes ont

ensuite été chauffés à 100°C pendant 10 minutes. L'absorbance a été mesurée à 620 nm après refroidissement des tubes. Une gamme d'étalonnage (Annexe 17) a été réalisée avec le peroxyde d'hydrogène (Tableau VI) dans les mêmes conditions que l'échantillon.

Tableau VI : Préparation des tubes pour l'étalonnage de l'activité de la catalase

Tubes tests	1	2	3	4	5
Volume de H₂O₂ (µL) 200 µmol/mL	0	20	40	80	160
Tampon (µL)	1000	980	960	920	940
Concentration de H₂O₂ finale (µmol/mL)	0	4	8	16	32
Solution de Dichromate/acide-acétique (mL)	2	2	2	2	2

iii) Expression des résultats

L'activité de la catalase a été exprimée en micromole de peroxyde d'hydrogène consommés/min/mg de protéine selon l'équation suivante :

$$\text{CAT } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{min/mg prot.}) = \frac{\Delta DO}{0,0048} \times \frac{v}{V \times t \times C}$$

DO = densité optique

ΔDO = DO control – DO échantillon

0,0048 = Coefficient directeur de regression linéaire issue de l'étalonnage

$\frac{\Delta DO}{0,0048}$ = Concentration de H₂O₂ consommée (µmol /mL)

v: volume de l'échantillon (mL)

V : volume totale de la réaction (mL)

t = temps réactionnel (1 minute)

C = quantité de protéine totale de l'extrait enzymatique (mg)

➤ **Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) (Flohe et Gunzler, 1984)**

i) Principe

Cette méthode est basée sur la diminution du taux de glutathion réduit (GSH) par rapport à la réaction non enzymatique et en utilisant H₂O₂ comme substrat.

ii) Mode opératoire

Des tubes à hémolyse en plastique contenant des volumes de 200 µL d'échantillon, 400 µL de GSH et 200 µL de tampon ont été incubés au bain marie à 25°C pendant 5 minutes et laissés au repos pendant 10 minutes. Un volume de 1 mL de TCA a été ajouté à chaque tube. Le mélange a ensuite été incubé dans la glace pendant 30 minutes puis centrifugé à 1 000 g pendant 10 minutes. A 400 µL du surnageant ont été ajoutés 1600 µL de tampon et 320 µL de DTNB. Les densités optiques ont été lues à 412 les 5 minutes suivant la réaction. Une gamme d'étalonnage (Annexe 18) a été réalisée avec le GSH (Tableau VII) dans les mêmes conditions que l'échantillon.

Tableau VII : Préparation des tubes pour l'étalonnage de la GPx

Tubes tests	1	2	3	4	5
GSH (µL) 0,1 mM	0	100	200	250	400
Tampon (µL)	2000	1900	1800	1750	1600
Concentration GSH finale (mM)	0	0,005	0,01	0,0125	0,02
DTNB (µL)	320	320	320	320	320

iii) Expression des résultats

L'activité de la GPx a été exprimée en micromole de GSH consommés/min/mg de protéine selon l'équation suivante :

$$\text{GPx } (\mu\text{mol GSH consommé/min/mg}) = \frac{\Delta DO}{0,022} \times \frac{v}{V \times t \times C}$$

DO = densité optique

ΔDO = DO control – DO échantillon

0,022 = Coefficient directeur de la regression linéaire issue de l'étalonnage

$$\frac{\Delta DO}{0,022} = \text{Concentration de GSH consommée } (\mu\text{mol /mL})$$

v : volume de l'échantillon (mL)

V : volume totale de la réaction (mL)

t = temps réactionnel (5 minutes)

C = quantité de protéine totale de l'extrait enzymatique (mg)

c) Dosage de l'activité antioxydante totale dans le plasma et les hémémolysats

➤ Capacité antioxydante totale du plasma

La capacité antioxydante totale du plasma a été déterminée par la méthode de Prieto et *al.* (1999) décrite plus haut. Les résultats ont été exprimés en microgramme d'équivalent acide ascorbique par millilitre de plasma.

➤ Test d'hémolyse des globules rouges (Arbos et *al.*, 2008).

i) Principe

L'évaluation est basée sur la réaction des hématies soumises à une agression de type oxydatif dans des conditions strictement contrôlées et standardisées. Les défenses antioxydantes intra et extracellulaires vont entrer en jeu pour résister à cette agression afin de maintenir l'intégrité membranaire et les fonctions cellulaires, jusqu'à ce que la membrane en soit modifiée au point de laisser échapper le contenu cellulaire. L'hémoglobine se retrouve alors dans le surnageant lorsque les antioxydants endogènes érythrocytaires sont consommés. Le suivi de l'hémolyse se fait par spectrophotométrie à 540 nm.

ii) Mode opératoire

Les globules rouges ont été séparés du surnageant (plasma et couche de globules blancs) par centrifugation à 1500 g pendant 15 minutes. Les globules rouges ainsi obtenus ont été lavés 3 fois avec du sérum physiologique (NaCl 0,9%). A un volume de 0,1 mL de la suspension de globules rouges a été ajouté 1 mL de NaCl, puis 0,1 mL de CuSO₄ pour induire l'hémolyse. La variation de l'absorbance a été suivie dans une cuve à 540 nm et à 37°C contre le blanc réalisé à partir de 1,1 mL de NaCl et 0,1 mL de la suspension pendant 45 minutes toutes les 5 minutes. Le temps pour atteindre 50% de l'hémolyse totale (HT₅₀ en minute) qui représente la défense totale contre les radicaux libres chez l'humain et les modèles animaux soumis au stress oxydatif a été déterminée.

iii) Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en HT_{50} . La HT_{50} a été déterminée graphiquement à partir de l'équation de la régression logarithmique issue de la courbe de variation du pourcentage d'hémolyse en fonction du temps.

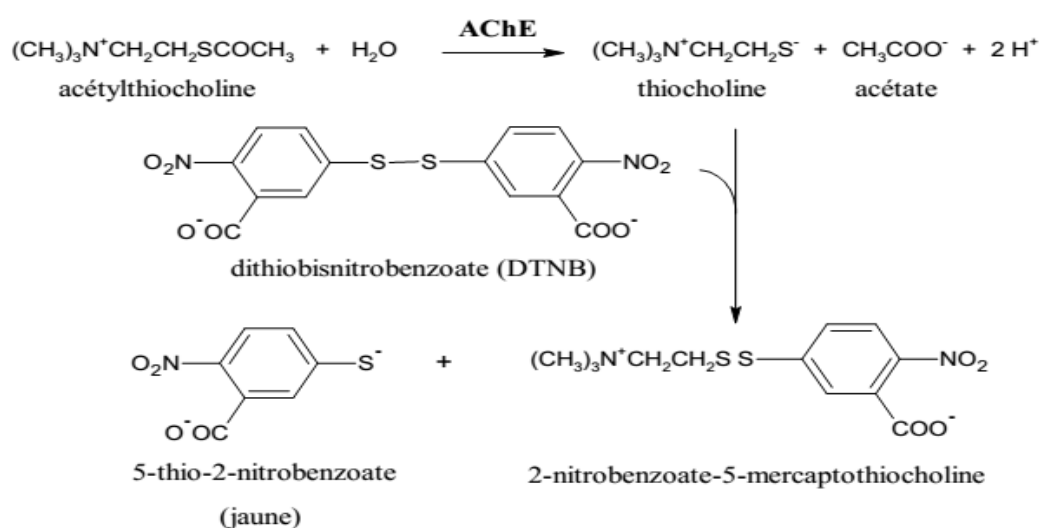
II.2.5.4.2. Dosages des marqueurs de la transmission cholinergique, de l'homéostasie du calcium et dosages des taux de cholestérol total, phospholipides totaux, plasmalogènes, triglycérides

a) Dosage des marqueurs de la transmission cholinergique

➤ Dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (Ellman et al., 1961)

i) Principe

La thiocholine formée lors de l'hydrolyse de l'acétylthiocholine par l'acétylcholinestérase (AChE) réagit rapidement avec l'acide 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque) (DTNB) et libère un anion de couleur jaune l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque, qui absorbe à 412 nm.



ii) Mode opératoire

Le mélange réactionnel dans des tubes à hémolyse contenait des volumes de 1000 μL de tampon phosphate, 100 μL de réactif d'Ellman (Annexe 6) et 25 μL d'iodeure d'acétylthiocholine. La réaction enzymatique a été initiée par ajout d'un volume de 10 μL d'échantillon. La variation de l'absorbance a été suivie dans une cuve à 412 nm et à 37°C au spectrophotomètre pendant 5 minutes. La variation de densité optique par minute a été mesurée.

iii) Expression des résultats

L'activité enzymatique en μmol d'acétylthiocholine hydrolysé/min/mg de protéine a été déterminée selon la formule suivante

$$AS = \frac{\Delta DO}{\varepsilon \times l \times S_n} \times \frac{v}{V \times C} \times 10^3$$

AS : Activité spécifique de l'AChE en $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de prot.⁻¹

ΔDO : variation de la densité optique par minute à 412 nm

l : longueur de la traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

$\varepsilon_{\text{DTNB}}$: coefficient d'extinction molaire de l'acide 5-thio-2- nitrobenzoïque à 412 nm ($1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

S_{DTNB} : nombre stoechiométrique de l'acide 5-thio-2- nitrobenzoïque dans l'équation de la réaction, soit : 1

V_s : volume de l'échantillon (mL)

V_t : volume totale de la réaction (mL)

C : quantité de protéine totale de l'extrait enzymatique (mg)

➤ Dosage de l'activité de la butyrylcholinestérase

Pour l'activité de la butyrylcholinestérase, le protocole suivi était le même que celui décrit précédemment (activité de l'acétylcholinestérase) à la seule différence que le substrat utilisé est l'iodure de butyrylthiocholine, qui est hydrolysé respectivement en acide butyrique et en thiocholine.

b) Dosage des marqueurs de l'homéostasie du calcium

➤ Dosage du calcium cérébral (Stern et Lewis, 1957)

i) Principe

A pH basique, les ions calcium forment avec le crésolphthaleine un complexe violet qui est mesuré à 575 nm et est proportionnel à la concentration des ions calcium présents.

ii) Mode opératoire

Dans des tubes à hémolyse en plastique contenant un volume de 50 μL d'échantillon ou de standard ou d'eau désionisée (blanc) ont été ajoutés 270 μL de la solution de réactif (Annexe 7) et 180 μL de tampon. Le mélange a été incubé pendant 10 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance a été lue à 575 nm contre le blanc.

iii) Expression des résultats

La concentration en ions calcium a été déterminée par la relation :

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{échantillon}} (\mu\text{mol/mL}) = \frac{DO_{\text{échantillon}}}{DO_{\text{Standard}}} \times [\text{Ca}^{2+}]_{\text{standard}}$$

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{standard}} = 0,29 \mu\text{mole/mL}$$

Les résultats ont été exprimés en $\mu\text{mol/mg}$ de protéine selon la formule :

$$[\text{Ca}^{2+}] (\mu\text{mol/mg de protéines}) = \frac{[\text{Ca}^{2+}] (\mu\text{mole/mL})}{\text{protéines mg/mL}}$$

➤ Dosage du magnésium cérébral (Farrell et al., 1984)

i) Principe

Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe coloré pourpre de magnésium qui absorbe à 520 nm, par réaction entre le magnésium et la calmagite en milieu alcalin. L'intensité de la coloration formée est proportionnelle à la concentration du magnésium dans l'échantillon.

ii) Mode opératoire

Un millilitre (1 mL) du réactif de travail (Annexe 8) a été introduit dans les tubes à essais. Ensuite, 10 μL de la solution standard de magnésium ont été ajoutés dans le tube standard et 10 μL d'échantillon dans le tube échantillon. Le mélange a été homogénéisé, puis incubé pendant 15 minutes à 37° C. L'absorbance a été lue à 520 nm.

iii) Expression des résultats

La concentration en ions magnésium a été déterminée par la relation :

$$[\text{Mg}^{2+}]_{\text{échantillon}} (\mu\text{mol/mL}) = \frac{DO_{\text{échantillon}}}{DO_{\text{Standard}}} \times [\text{Mg}^{2+}]_{\text{standard}}$$

$$[\text{Mg}^{2+}]_{\text{standard}} = 0,824 \mu\text{mole/mL}$$

Les résultats ont été exprimés en $\mu\text{mol/mg}$ de protéine tel décrit plus haut.

➤ **Dosage de l'activité des ATPases**

i) Principe (Rohn *et al.*, 1993)

L'hydrolyse de l'ATP conduit à une libération de protons, qui s'accompagne de la formation d'ADP et de phosphate inorganique. Le phosphate inorganique (Pi) ainsi libéré est dosé par une méthode colorimétrique utilisant une solution d'ammonium molybdate.

ii) Mode opératoire

Réaction d'hydrolyse de l'ATP

Dans des tubes à hémolyse en plastique ont été introduits 850 µL d'une solution de tampon HCl-Tris (30 mM ; pH 7,5) contenant : (Tableau VIII)

Tableau VIII : Préparation des tubes pour le dosage de l'activité des ATPases

Tube 1		Tube 2		Tube 3	
Réactifs	Concentration finale	Réactifs	Concentration finale	Réactifs	Concentration finale
Histidine	18 mM	Histidine	18 mM	Histidine	18 mM
NaCl	150 mM	NaCl	150 mM	NaCl	150 mM
KCl	15 mM	KCl	15 mM	KCl	15 mM
MgCl ₂	15 mM	MgCl ₂	15 mM	MgCl ₂	15 mM
EGTA	0,1 mM	Ouabaine	1,5 mM	Ouabaine	1,5 mM
		EGTA	0,1 mM	CaCl ₂	0,3 mM

Cinquante microlitres d'homogénat ont été ajoutés dans chaque tube. Les tubes ont été homogénéisés et préincubés à 37°C pendant 10 minutes. La réaction a été initiée par ajout de 100 µL ATP (concentration finale de 5 mM) mettant le volume final de la réaction à 1000 µL. Après 60 minutes d'incubation à 37°C, la réaction enzymatique a été stoppée par addition de 1 mL d'acide trichloracétique (10%) froid, puis une mise en incubation des échantillons durant 10 minutes dans la glace. Les tubes ont été centrifugés à 1000 g pendant 10 minutes et la quantité de phosphate inorganique présente dans le surnageant a été mesurée.

Estimation du phosphate inorganique présent (Baginski *et al.*, 1967)

Dans des tubes à hémolyse et en plastique, 200 μL du volume total de la réaction ont été introduits suivit d'une addition rapide de 500 μL du réactif A (contenant 3% d'acide ascorbique dans une solution de 0,5 N de HCl et 0,5 % de molybdate d'ammonium). Les tubes ont été gardés dans de la glace pendant 10 minutes. Ensuite, 1000 μL du réactif B (contenant 2% sodium meta-arsénite, 2% de citrate de sodium dans 2% d'acide acétique) ont été ajoutés. Après 10 minutes à 37°C, l'absorbance de la coloration formée a été lue à 850 nm. Les valeurs des densités optiques obtenues ont été converties en valeurs d'activité par la régression linéaire utilisant la courbe standard du phosphate de sodium monobasique (Annexe 19) qui a été évalué dans les mêmes conditions.

iii) Expression des résultats

L'activité de la Mg^{2+} -ATPase est celle en présence de l'ouabaïne (inhibiteur de la Na^+ , K^+ -ATPase) et de l'EGTA (inhibiteur de la Ca^{2+} -ATPase) et en absence de calcium (tube 2). L'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase a été déterminée en soustrayant l'activité ouabaïne insensible (activité Mg^{2+} -ATPase) de celle en présence de l'EGTA et en absence de calcium et de l'ouabaïne (tube 1). L'activité de la Ca^{2+} -ATPase a été déterminé en soustrayant l'activité Mg^{2+} -ATPase de celle déterminée en présence du calcium et de l'ouabaïne (tube 3).

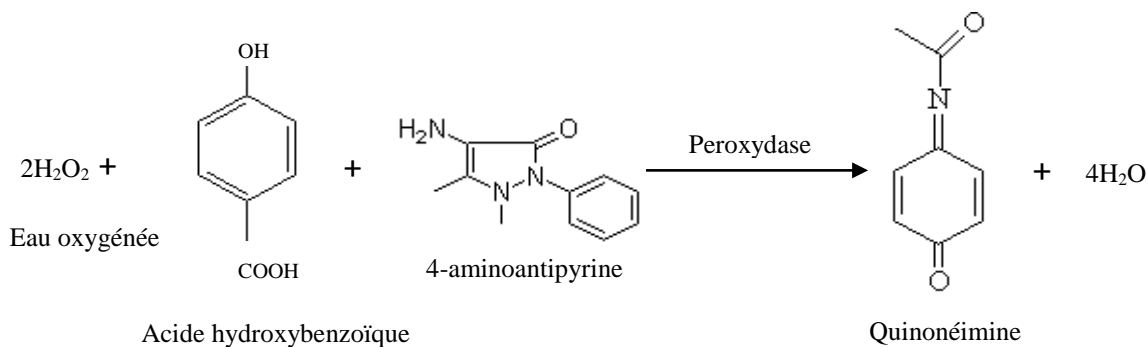
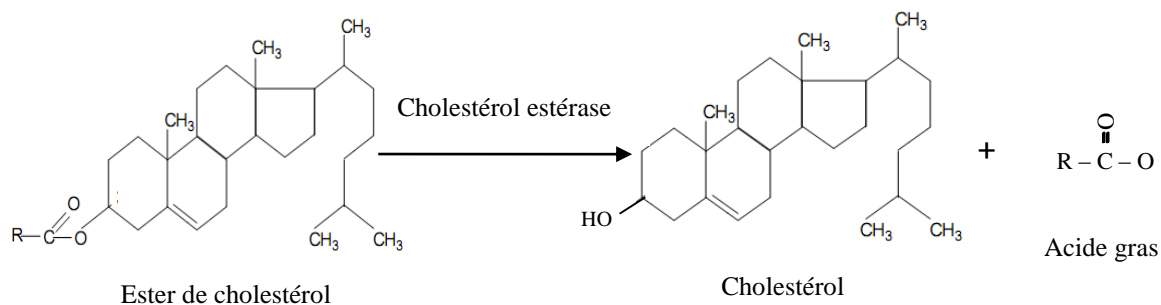
L'activité ATPasique a été exprimée en μmol de phosphate inorganique libéré (Pi)/heure/mg de protéine.

c) Dosage des taux de cholestérol total, phospholipides totaux, glycérophospholipides plasmalogène et triglycérides

➤ Dosage du cholestérol total (Richmond, 1973)

i) Principe

La cholestérol estérase (EC 3.1.1.3) catalyse l'hydrolyse des esters de cholestérol en cholestérol libre et acides gras. Le cholestérol libre y compris celui présent à l'origine est alors oxydé par la cholestérol oxydase (EC 1.1.1.6) en 4-cholestèn-3-one et en peroxyde d'hydrogène. En présence de la peroxydase (EC 1.11.1.9), le phénol et le 4-aminoantipyrine se combinent avec le peroxyde d'hydrogène pour former un chromophore rouge (la quinonéimine) qui absorbe entre 500 et 550 nm. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol total présent dans l'échantillon.



ii) Mode opératoire

Dans des tubes à hémolyse en plastique étiquetés blanc, étalon et essai, ont été introduits respectivement 10 μL d'eau désionisée, d'étalon ou d'échantillon à analyser et 1000 μL de réactif (Annexe 9). Les tubes ont été homogénéisés et incubés pendant 5 minutes à 37 °C. L'absorbance a été lue à 505 nm contre le blanc.

iii) Expression des résultats

La concentration en cholestérol total dans le plasma est donnée par la relation suivante:

$$[\text{Cholestérol total}](\text{mg/dL}) = \frac{\text{Absorbance de l'essai}}{\text{Absorbance de l'étalon}} \times [\text{étalon}] (\text{mg/dL})$$

Concentration de l'étalon = 200 mg/dL

Conversion en unité SI (mmol/L) : $0,0259 \times [\text{cholestérol total}] (\text{mg/dL})$

Dans le cerveau les teneurs en cholestérol ont été exprimées en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéine totale.

$$\text{Cholestérol total } (\mu\text{g} / \text{mg de protéines}) = \frac{\text{cholesterol } (\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}})}{\text{protéines mg/mL}}$$

➤ Dosage des phospholipides totaux (Stewart, 1980)

i) Principe

Cette méthode colorimétrique est basée sur la formation d'un complexe coloré entre les phospholipides et le ferrothiocyanate d'ammonium. Le complexe coloré formé possède un maximum d'absorption à 488 nm.

ii) Mode opératoire

Un volume de 100 µL d'extrait lipidique a été évaporé sous courant d'azote puis repris dans 2 mL de chloroforme. Un millilitre de réactif (solution aqueuse de trichlorure de fer et de thiocyanate d'ammonium) a été ajouté et le mélange homogénéisé à l'agitateur de tube (Vortex) pendant 30 secondes, puis centrifugé 10 minutes à 6000 g. L'absorbance de la phase chloroformique inférieure a été mesurée à 488 nm contre le blanc (2 mL chloroforme + 1 mL de réactif). Une gamme étalon a été réalisée pour des quantités de phosphatidylcholine (PC) (0, 10, 20, 40, 50, 80, 100 µg/mL).

iii) Expression des résultats

La teneur en phospholipides totaux a été calculée à partir de l'équation de la régression linéaire de la gamme d'étalonnage établie avec la phosphatidylcholine (Annexe 20). Les résultats ont été exprimés en µg d'équivalent de phosphatidylcholine (µg Eq PC) par mg de protéine (µg Eq. PC/mg protéine).

➤ Dosage des plasmalogènes totaux (Gottfried et Rapport, 1962)

i) Principe

Cette méthode est basée sur la réaction des groupements éthers vinyliques du plasmalogène avec l'iode suivit à 355 nm.

ii) Mode opératoire

Un volume de 100 µL d'extrait lipidique a été évaporé sous courant d'azote puis repris dans 0,5 mL de méthanol. Un volume de 0,5 mL de réactif d'iode a été ajouté au mélange. Le mélange a été agité vigoureusement pendant 1 minute et laissé à température ambiante pendant 10 minutes. Un tube contrôle a été exécuté simultanément dans lequel l'échantillon a été omis. Après addition de 4,0 mL d'éthanol à 95%, le mélange a été agité vigoureusement et l'absorbance lue à 355 nm contre le blanc dans lequel 0,5 mL de KI à 3% a été ajouté à l'échantillon à la place du réactif d'iode.

iii) Expression des résultats

Les teneurs en plasmalogènes totaux des échantillons ont été calculées à l'aide de la formule suivante :

$$(moles\ de\ groupes\ vinylyls) = \frac{DO(contrôle\ d'iode) - DO(échantillon)}{\epsilon \times l} \times fd$$

DO : densité optique

ϵ : coefficient d'extinction molaire de l'iode à 355 nm ($27500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l : longueur de la traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

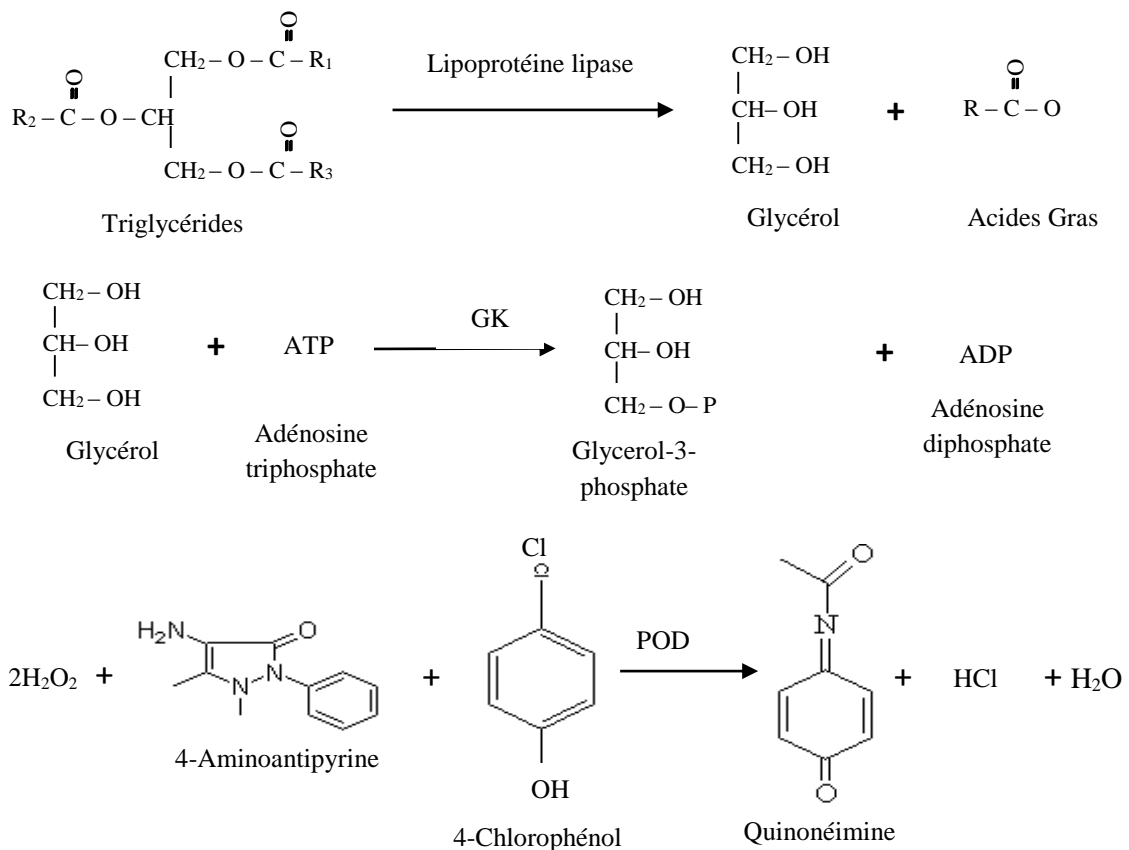
fd : facteur de dilution

Les résultats ont été exprimés dans le cerveau en nmoles de groupes vinyle / mg de protéine totale et dans les érythrocytes et le plasma en mmoles de groupes vinyle / L (mM).

➤ Dosage des triglycérides (Fossati et Principe, 1982)

i) Principe

Sous l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) (EC 3.1.1.34), le glycérol produit par hydrolyse enzymatique des triglycérides, est phosphorylé par l'ATP pour produire le glycérol-3-phosphate et l'ADP à travers une réaction catalysée par la glycérol kinase (GK) (EC 2.7.1.30). La glycérol-3-phosphate oxydase (GPO) (EC 1.1.3.21) catalyse ensuite l'oxydation du glycérol-3-phosphate pour produire le dihydroxyacétone-3-phosphate et H_2O_2 . Ce dernier se combine au 4-aminoantipyrine et au 4-chlorophénol pour former la quinonéimine sous l'influence catalytique de la peroxydase (POD) (EC 1.11.1.9). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des triglycérides présents dans l'échantillon.



ii) Mode opératoire

Dans des tubes à hémolyse en plastique étiquetés blanc, étalon et essai, ont été introduits respectivement 10 µL d'eau désionisée (blanc), d'étalon ou d'échantillon à analyser et 1000 µL de réactif. Les tubes ont été homogénéisés et incubés pendant 5 minutes à 37 °C. L'absorbance a été lue à 505 nm contre le blanc.

iii) Expression des résultats

La concentration en triglycérides dans le plasma est calculée selon la formule suivante :

$$[\text{Triglycérides}](\text{mg/dL}) = \frac{\text{Absorbance de l'essai}}{\text{Absorbance de l'étalon}} \times [\text{étalon}] (\text{mg/dL})$$

Concentration étalon = 200 mg/dL

Conversion en unité SI (mmol/L) : [triglycérides] mg/dL × 0,0113

II.2.5.4.3. Dosage des marqueurs du métabolisme du glucose

➤ Dosage du glucose (Bergmeyer et Bernt, 1974)

i) Principe

C'est une méthode enzymatique basée sur l'oxydation du glucose en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène par la glucose oxydase. Le peroxyde d'hydrogène formé réagit avec le O-dianisidine en présence de la peroxydase pour former un produit coloré. La O-dianisidine oxydé réagit avec l'acide sulfurique pour former un complexe coloré plus stable. L'intensité de la couleur rose est mesurée à 540 et est proportionnelle à la concentration de glucose présente dans l'échantillon.

ii) Mode opératoire

Dans des tubes à hémolyse en plastique contenant un volume de 50 µL d'échantillon, ou standard ou blanc (eau désionisée), la réaction a été initiée par ajout de 250 µL du réactif (Annexe 11). Le mélange a été incubé pendant 30 minutes à 37°C. La réaction a été stoppée par ajout de 250 µL de H₂SO₄ dans chaque tube. Les tubes ont été agités vigoureusement. L'absorbance a été mesurée à 540 nm contre le blanc.

iii) Expression des résultats

La concentration en glucose est déterminée par la relation :

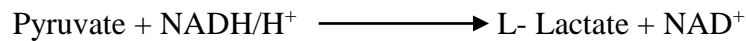
$$[\text{glucose}]_{\text{échantillon}} (\mu \text{ mol/mL}) = \frac{DO_{\text{échantillon}}}{DO_{\text{standard}}} \times [\text{glucose}]_{\text{standard}}$$

Les résultats ont été exprimés en $\mu\text{mol/g}$ de tissus frais dans le cerveau et en mmol/L dans le plasma.

➤ **Dosage de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) (Bergmeyer et Bernt, 1963)**

i) Principe

En présence de pyruvate et de NADH/H^+ , la LDH produit du lactate et le NAD^+ . Selon la réaction suivante :



Cette cinétique peut être évaluée à l'aide du NADH, en effet le NADH absorbe à 340 nm et par conséquent l'activité de la LDH a été évaluée en suivant la décroissance de l'absorbance à 340 nm.

ii) Mode opératoire

Dans des tubes à hémolyse et en plastique contenant un volume de 2,85 mL de pyruvate, ont été introduits 50 μL d'une solution de NADH. La réaction a été initiée par ajout de 100 μL d'homogénat ou d'eau distillée (blanc). Les tubes ont été homogénéisés et la variation de l'absorbance a été suivie dans une cuve à 340 nm et à 30°C pendant 5 minutes chaque minute. La variation de densité optique par minute a été mesurée.

iii) Expression des résultats

Une unité enzymatique est définie comme la quantité qui forme 1 μmol de NAD^+ par minute à 30° C

$$AS = \frac{\Delta DO}{\varepsilon \times l \times S_n} \times \frac{v}{V \times C}$$

AS : Activité spécifique LDH en $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de prot.⁻¹

ΔDO : variation de densité optique par minute à 340 nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

$\varepsilon_{\text{NADH}}$: coefficient d'extinction molaire du NADH à 340 nm ($6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

S_{NADH} : nombre stoechiométrique du NADH dans l'équation de la réaction, soit : 1

v : volume de l'échantillon (mL)

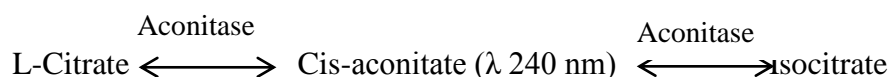
V : volume totale de la réaction (mL)

C : quantité de protéine totale de l'extrait enzymatique (mg)

Dosage de l'activité de l'Aconitase (Krebs et Holzach, 1952)

i) Principe

L'aconitase est une enzyme du cycle de l'acide citrique. Cette protéine catalyse la réaction d'interconversion du citrate en isocitrate via le cis-aconitate. Le dosage consiste à mesurer le cis-aconitate absorbant à 240 nm.).



ii) Mode opératoire

Des tubes à hémolyse en plastique contenant des volumes de 495 μL de tampon Tris-HCl, 50 μL de chlorure de manganèse, 200 μL d'isocitrate de sodium, et 230 μL d'eau distillée ont été incubés pendant 5 minutes à 37°C. La réaction a été initiée par ajout de 25 μL d'homogénat de cerveau. La variation de l'absorbance a été suivie dans une cuve à 240 nm et à 37°C contre le blanc pendant 240 secondes toutes les 30 secondes. La variation de densité optique par minute a été mesurée.

iii) Expression des résultats

L'activité enzymatique en nmol de cis-aconitate/minute/mg de protéine a été déterminée selon la formule suivante :

$$AS = \frac{\Delta DO}{\epsilon \times l \times S_n} \times \frac{v}{V \times C} \times 10^3$$

AS : Activité spécifique aconitase en $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de prot.⁻¹

ΔDO : variation de densité optique par minute à 240 nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

ϵ_{ACO} : coefficient d'extinction molaire du cis-aconitate à 240 nm ($3,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

S_{ACO} : nombre stoechiométrique du cis-aconitate dans l'équation de la réaction, soit : 1

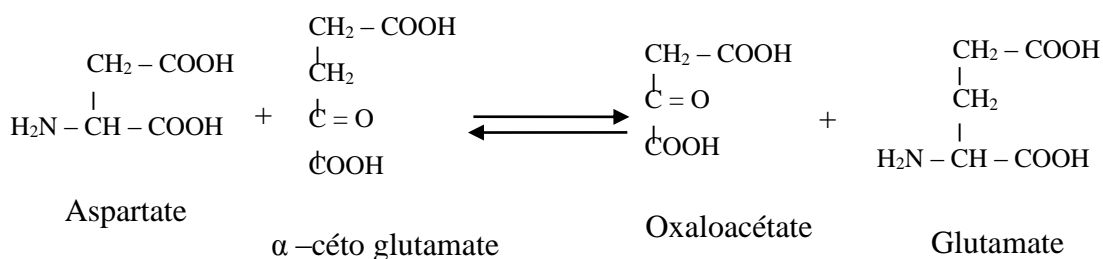
C : quantité de protéine totale de l'extrait enzymatique (mg)

II.2.5.4.4. Dosages des paramètres plasmatiques de toxicité

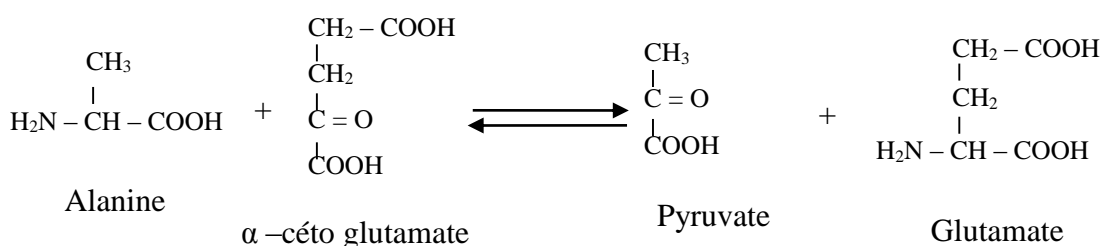
➤ Dosage de l'activité des transaminases (Franckel, 1957)

i) Principe

L'ASAT : Aspartate amino transférase (EC 2.6.1.1) catalyse le transfert du groupement amine de l'acide L-aspartique sur l' α -cétoglutarate pour former l'oxaloacétate et le L-glutamate suivant l'équation :



L'ALAT : Alanine amino transf\u00e9rase (EC 2.6.1.2) catalyse le transfert du groupement amine du L-alanine sur l' α -c\u00e9toglutarate pour former le pyruvate et le L-glutamate suivant l'\u00e9quation :



L'oxaloac\u00e9tate et le pyruvate form\u00e9s r\u00e9agissent avec le 2,4-dinitroph\u00e9nylhydrazine (2,4-DNPH) pour donner le 2,4-dinitroph\u00e9nylhydrazone (complexe de couleur brun). L'intensit\u00e9 de la coloration est directement proportionnelle \u00e0 la quantit\u00e9 d'oxaloac\u00e9tate ou de pyruvate qui pr\u00e9sente un maximum d'absorption \u00e0 505 nm contre le blanc.

- **Evaluation de l'activit\u00e9 de l'ASAT**

Cent microlitres (100 μL) de la solution de substrat (Annexe 12) ont \u00e9t\u00e9 introduits dans les tubes. Ces tubes ont ensuite \u00e9t\u00e9 pr\u00e9-incub\u00e9s \u00e0 37°C pendant 5 minutes, puis 20 μL d'\u00e9chantillon ont \u00e9t\u00e9 ajout\u00e9s dans les tubes essais. Apr\u00e8s homog\u00e9n\u00e9isation, ils ont \u00e9t\u00e9 incub\u00e9s \u00e0 37 °C pendant 1 heure et 100 μL du r\u00e9actif de coloration ont ensuite \u00e9t\u00e9 ajout\u00e9s. Les tubes ont \u00e9t\u00e9 laiss\u00e9s \u00e0 temp\u00e9rature ambiante pendant 20 minutes, puis la r\u00e9action a \u00e9t\u00e9 arr\u00eat\u00e9e par ajout de 1 mL de NaOH. Les absorbances ont \u00e9t\u00e9 lues \u00e0 505 nm. L'\u00e9talonnage a \u00e9t\u00e9 r\u00e9alis\u00e9 comme suit (Tableau IX):

Tableau IX: Pr\u00e9paration des tubes pour l'\u00e9talonnage de l'activit\u00e9 des transaminases

Tubes	1	2	3	4	5	6
Eau distill\u00e9e (mL)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Substrat GOT (mL)	0,1	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05
Pyruvate de sodium (mL)	0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
DNPH	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Incubation 20 minutes à température ambiante						
NaOH (mL)	1	1	1	1	1	1
Laisser à température ambiante pendant 5 minutes et lire la DO à 505 nm contre le blanc						
Activités correspondantes						
GOT (unités d'ASAT/mL)	00	22	55	95	150	215
GPT (unités d'ALAT/mL)	00	25	50	83	126	200

- **Evaluation de l'activité de l'ALAT**

Pour l'ALAT (substrat ALAT Annexe 12), le protocole suivi était le même que celui décrit précédemment à la seule différence que le temps d'incubation était de 30 minutes.

ii) Expression des résultats

Les activités des transaminases ont été déterminées à l'aide des équations des régressions linéaires issues des courbes d'étalonnage (Annexe 21). Ces activités ont été exprimées en unité internationale par millilitre (UI/mL).

$$\text{Unité d'ASAT/mL} = \text{DO échantillon} / 0,0009$$

$$\text{Unité d'ALAT/mL} = \text{DO échantillon} / 0,0008$$

DO= Densité optique

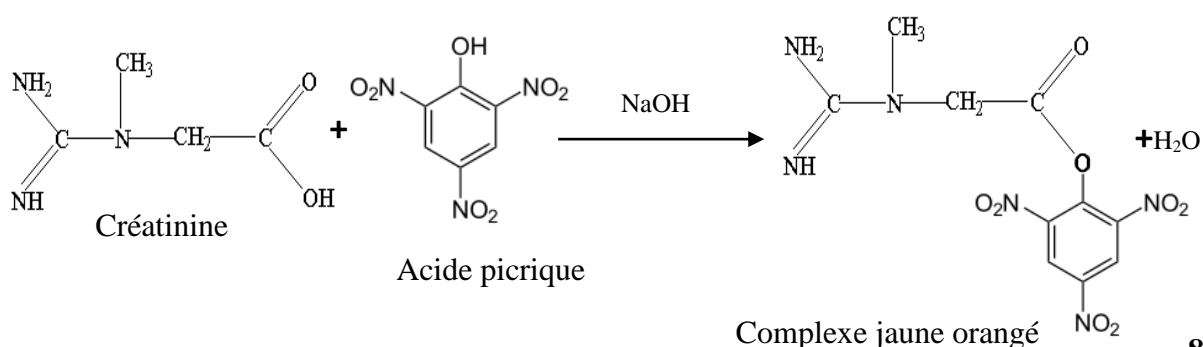
0,0009 = Coefficient directeur de la droite issue de l'étalonnage de l'ASAT

0,0008 = Coefficient directeur de la droite issue de l'étalonnage de l'ALAT

➤ **Créatinine**

i) Principe (Bartels et al., 1972)

En milieu alcalin, la créatinine forme un complexe jaune-orangé avec l'acide picrique, qui absorbe à 520 nm. L'intensité de la coloration étant fonction de la concentration de la créatinine dans le milieu.



ii) Mode opératoire

Dans un tube à essai, 100 µL d'échantillon ont été ajoutés à 1 mL de la solution de travail (Annexe 13). Après agitation, l'absorbance a été lue à 520 nm à 30 et à 90 secondes après stabilisation du mélange.

iii) Expression des résultats

La concentration en créatinine a été déterminée à partir de l'étalon créatinine

$$\text{Créatinine } (\mu\text{M}) = \frac{\Delta\text{DO (échantillon)}}{\Delta\text{DO (étalon)}} \times \text{concentration étalon } (\mu\text{M})$$

DO : densité optique

ΔDO : variation de densité optique par minute à 520 nm

Concentration de l'étalon = 177,80 µM

II.2.5.4.5. Dosages de protéines totales (Lowry *et al.*, 1951)

i) Principe

La méthode repose sur la capacité des groupements azotés des peptides à réagir avec les ions cuivriques (Cu^{2+}) en milieu alcalin et sur la réduction de l'acide phosphotungstique du réactif de Folin-Ciocalteu en hétéropolymolybdénum de couleur bleue par l'oxydation des acides aromatiques catalysée par le cuivre. L'absorbance est directement proportionnelle à la concentration protéique.

ii) Mode opératoire

Dans des tubes à hémolyse et en plastique ont été introduits 100 µL d'échantillon ou de NaCl (blanc) et 1000 µL du réactif 1 (Annexe 14). Le mélange a été incubé à 25°C pendant 10 minutes, puis 100 µL du réactif 2 (Annexe 14) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été incubé à 25°C pendant 30 minutes. L'absorbance a été lue à 750 nm. La gamme d'étalon a été réalisée comme suit (Tableau X) :

Tableau X : Préparation des tubes pour l'étalonnage des protéines totales

Tubes test	0	1	2	3	4	5	6
Standard BSA (mL)	–	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1
NaCl 0,9% (mL)	0,1	0,09	0,08	0,06	0,04	0,02	–
Conc BSA (mg/mL)	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1

Réactif (1 mL)	1	1	1	1	1	1	1
Réactif (2 mL)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

iii) Expression des résultats

La concentration en protéine totale a été déterminée à partir de l'équation de régression linéaire issue de la courbe d'étalonnage (Annexe 22) réalisée avec la solution de BSA .

$$\text{Concentration protéique (mg/mL)} = \text{DO échantillon} / 0,185$$

DO= Densité optique

0,185 = Coefficient directeur de la droite issue de l'étalonnage

II.2.5.5. Etudes histopathologiques

Les lésions tissulaires au niveau de l'hippocampe ont été étudiées en utilisant les techniques de marquage des coupes à l'hématoxyline-éosine (H&E) et de marquage des coupes au crésyl violet.

II.2.5.5. 1. Marquage à l'hématoxyline-éosine (H&E) (Schmued et al., 1997)

i) Principe

La coloration à l'hématoxyline & éosine (H&E) est la méthode de coloration la plus courante pour matériel histologique. Le fonctionnement est un procédé physico-chimique. Dans un premier temps, le colorant du noyau chargé positivement (l'hématoxyline) se fixe sur les groupes phosphates chargés négativement des acides nucléiques du noyau cellulaire. Les noyaux prennent alors une couleur variant entre le bleu foncé et le violet foncé. La seconde étape réside dans la contre-coloration à un colorant xanthène anionique chargée négativement (éosine). Le colorant se fixe aux protéines plasmatiques chargées positivement. Le cytoplasme et les substances intercellulaires se colorent en rose à rouge, les érythrocytes apparaissent en jaune à orange. Le H&E reproduit le même schéma de marquage des neurones dégénérés que celui obtenu avec d'autres marqueurs tels que fluoro-jade B.

ii) Protocole

Une coloration à l'hématoxyline & éosine a été réalisée sur une série de coupes suivant le protocole de Suvarna et al. (2019).

➤ **Recoupe ou “trimming”**

Après fixation, une coupe transversale de tissu de cerveau de rate a été prélevée et placée dans des cassettes en plastique préalablement étiquetées.

➤ **Déshydratation**

Au cours de cette étape, les cassettes ont préalablement été introduites, à une durée déterminée, dans 6 bacs contenant de l'alcool éthylique de degrés croissants : 1 bac d'éthanol 70° (1 h), 2 bacs d'éthanol 95° (1 h et 1 h 30), et 3 bacs d'éthanol 100° (1 h, 1 h 30 et 2 h) (déshydratation proprement dite). Après la sortie du 3^e bac d'alcool 100°, les cassettes ont séjourné dans deux bains de xylène pendant 1 h et 1 h30 respectivement (éclaircissement), puis dans une série de 3 bacs de paraffine en fusion (60°C) à raison de 1 h, 1 h30 et 2 h respectivement (imprégnation).

➤ **Inclusion**

L'inclusion permet de fournir un support externe solide aux tissus en vue de la réalisation de coupes fines. Les portions d'organe ont été placés selon un sens d'orientation déterminé dans des moules en acier inoxydable, puis la surface du moule a été recouverte par la base de la cassette et le moule a été rempli de paraffine en fusion. Le tout a été mis à solidifier sur une plaque réfrigérante.

➤ **Coupe**

Des coupes sériées, dans le plan frontal des blocs de paraffine contenant les organes, ont été réalisées à l'aide d'un microtome Reichert-Jung 2030. Les séries réalisées avaient une épaisseur de coupe de 25 µm. Les sections de rubans obtenues ont été mises à déplier dans un bain marie (40°C) contenant de l'eau gélatinée (1 ‰), puis récupérées sur des lames porte objet propres préalablement étiquetées. Les lames ont ensuite séjourné pendant 24 heures dans une étuve à 45°C.

➤ **Coloration**

La coloration permet d'obtenir une différenciation tinctoriale des éléments cellulaires ou tissulaires. Au cours de cette étape, les coupes ont subi un déparaffinage et une réhydratation avant d'être colorées. Lors du déparaffinage, les coupes ont séjourné dans 3 bains de xylène (5 minutes par bain). Elles ont par la suite été réhydratées en passant successivement dans des bains d'alcool de degrés décroissants (3 bacs d'éthanol 100°, 1 bain d'éthanol 95°, et un bain d'éthanol 70°) et rincées à l'eau distillée à raison de 5 minutes. Les lames ont été plongées dans l'hématoxyline de Mayer (substance basophile qui colore les composants nucléaires en bleu-

noir) pendant 10 minutes puis rincées à l'eau courante. Ensuite, elles ont été plongées successivement dans des bacs contenant de l'éthanol 70° et 90°, 5 minutes par bain. Les lames ont séjourné 5 minutes dans de l'éosine alcoolique 0,5 % (substance acidophile qui colore le cytoplasme en rose-rouge).

➤ **Montage et observation**

Après la coloration, les lames ont été déshydratées dans trois bains d'éthanol 100° puis éclaircies dans trois bains de xylène (5 minutes par bain). Une fois sortie du xylène, quelques gouttes de résine ont été déposées sur les coupes, puis ces dernières ont été recouvertes à l'aide de lamelles de verre pour observation au microscope. Le microscope (Scientico STM-50) utilisé, était muni d'une caméra digitale de marque Celestron 44421 connectée à un ordinateur Toshiba Tecra A9. Le logiciel digital microscope suit 2.0 a été utilisé pour la prise des microphotographies.

II.2.5.5.2. Marquage au crésyl violet (Franklin et Paxinos, 1997)

i) Principe

La coloration au crésyl violet est utilisée pour étudier la morphométrie ; c'est un marqueur histologique classique du neurone car il colore les nucléoles du noyau (-violet) et les corps de Nissl (Violet), organites spécifiques du corps cellulaire du neurone. La densité de marquage est directement proportionnelle à la quantité des corps cellulaires neuronaux. L'étude structurale peut être appréhendée soit par mesure de la largeur ou de l'épaisseur lorsqu'il s'agit de faisceaux de fibres soit par mesure de la surface lorsque les limites de la structure sont définies, ou soit encore par mesure de l'absorbance des structures nerveuses colorées au crésyl-violet, celle-ci donnant une mesure de la densité tissulaire (fibres et cellules). L'association des deux mesures (surface et pourcentage d'absorbance) renseigne sur la nature de la lésion tissulaire. En effet, lorsque une atrophie tissulaire est constatée (diminution de surface), le pourcentage d'absorbance du marquage au crésyl-violet peut varier. Une diminution de densité de marquage signe une perte cellulaire ; une augmentation de densité de marquage peut signifier en revanche, soit une perte des fibres afférentes ou de passage sans perte cellulaire (la structure se contracte, les corps cellulaires se rapprochent les uns des autres augmentant la densité de marquage).

ii) Protocole

Une coloration au crésyl violet a été réalisée sur une série de coupes suivant le protocole de Suvarna et *al.* (2019).

➤ **Fixation**

Des coupes de tissu montées sur des lames gélatinées ont été fixées à la formaline pendant 24 heures. Elles ont ensuite été rincées dans de l'eau distillée (1 rinçage rapide suivi d'un rinçage de 5 min).

➤ **Dégraissage**

Le dégraissage des tissus s'est effectué par trempages successifs (3 min chacun) des lames dans une série ascendante puis une série descendante de bains d'alcool, (alcool 50°, 70°, 96°, 100°(2 fois), xylène, 100° (2 fois), 96°, 70°, 50°). Le rinçage des lames s'est fait à l'eau distillée pendant 5 min.

➤ **Coloration des lames**

La coloration des lames s'est faite par immersion pendant 30 min dans la solution de crésyl Violet. Un rinçage rapide des lames a été effectué pour éliminer l'excès de colorant, ensuite les lames ont été immergées dans une série de bains d'alcool 50°, 70°, 96°, 100° (2 fois), xylène (2 fois), 3 min chacune.

➤ **Déshydratation**

La déshydratation sert à différencier la coloration (la myéline perd la coloration alors que le corps cellulaire la conserve). Cette différenciation est accélérée en acidifiant légèrement les bains d'alcool 70° et 96° avec de l'acide acétique.

➤ **Montage des lames**

Les corps de Nissl sont colorés en violet, le corps cellulaire neuronal en violet pâle et les nucléoles du noyau en bleu-violet. L'observation s'est faite à l'aide d'un microscope (Scientico STM-50), muni d'une caméra digitale de marque Celestron 44421 connectée à un ordinateur Toshiba Tecra A9. Le logiciel digital microscope suit 2.0 a été utilisé pour la prise des microphotographies. L'histomorphométrie a été réalisée grâce au logiciel Image J 1.3.

II.2.6. Analyses statistiques

Le logiciel SPSS (*Statistical Package for Social Science*) version 17.0 pour Windows a été utilisé pour l'analyse statistique des résultats. Le test d'ANOVA (*Analysis Of Variance*) à un facteur suivi d'un test *post-hoc* (LSD) a été utilisé pour comparer les moyennes des différents groupes. Tous les résultats ayant un $p < 0,05$ ont été considérés comme significatifs. Les résultats ont été exprimés sous la forme de moyenne \pm écart-type ou moyenne \pm erreur sur la moyenne.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Résultats

III.1.1. Teneurs en composés bioactifs et potentiel antioxydant des extraits aqueux, hydroéthanolique et éthanolique d'*A. congolensis*

III.1.1.1. Teneurs en composés phénoliques

Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en proanthocyanes des extraits d'écorces de *A. congolensis* ont été exprimées sous forme de moyennes \pm écart-types et représentées dans le tableau XI.

Tableau XI : Teneurs en composés bioactifs des extraits d'*A. congolensis*

Composés bioactifs	EAAC	EHEAC	EEAC
Polyphénols totaux (mg EAG/g MS)	12,50 \pm 0,63	44,82 \pm 1,47	28,77 \pm 2,39
Flavonoïdes (mg EQ/g MS)	7,81 \pm 0,022	27,61 \pm 0,228	14,93 \pm 0,133
Proanthocyanes (mg EAC/g MS)	3,06 \pm 0,250	14,37 \pm 0,50	6,60 \pm 0,179

EAAC : Extrait aqueux d'*Aufranella congolensis* ; *EHEAC* : extrait hydroéthanolique d'*Aufranella congolensis* ; *EEAC* : extrait éthanolique d'*Aufranella congolensis* ; *EAG* : équivalent acide gallique ; *EQ* : équivalent quercétine ; *EAC* : équivalent acide cyanidique ; *MS* : matière sèche

Ces résultats montrent que tous les trois extraits contiennent les composés bioactifs d'intérêts. Cependant, les teneurs en polyphénols totaux sont plus élevées au niveau de l'extrait hydroéthanolique (EHEAC), suivi des extraits éthanolique (EEAC) et aqueux (EAAC) : EHEAC > EEAC > EAAC. Les teneurs en flavonoïdes et proanthocyanes suivent la même logique que ceux des polyphénols : EHEAC > EEAC > EAAC.

III.1.1.2. Potentiel antioxydant des différents extraits

Le potentiel antioxydant de trois extraits a été mesuré à travers trois méthodes. Les résultats sont présentés sous forme de CP50 :

➤ Capacité antioxydante totale des extraits

La figure 25 ci-dessous présente la capacité antioxydante totale des extraits.

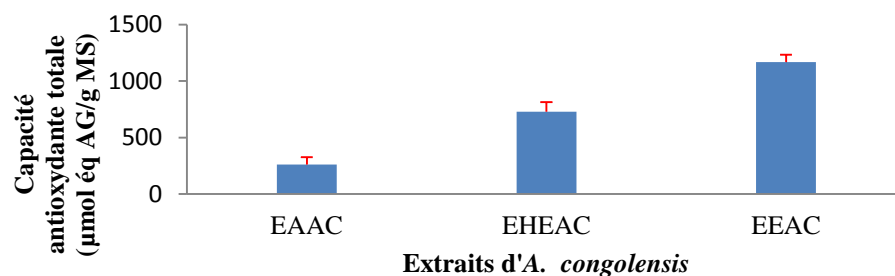


Figure 25 : Capacité antioxydante des extraits

EAAC : Extrait aqueux d'*Autranella congolensis* ; *EHEAC* : extrait hydroéthanolique d'*Autranella congolensis* ; *EEAC* : extrait éthanolique d'*Autranella congolensis*.

Les résultats montrent que la capacité antioxydante totale de l'extrait hydroéthanolique (EHEAC) est la plus importante suivie des extraits éthanolique (EEAC) et aqueux (EAAC) : EHEAC > EEAC > EAAC.

➤ Piégeage du radical DPPH•

L'activité anti-radicalaire des différents extraits d'*A. congolensis* vis-à-vis du radical DPPH• exprimée en CP₅₀ (μg/mL) est présentée dans la figure 26 ci-dessous.

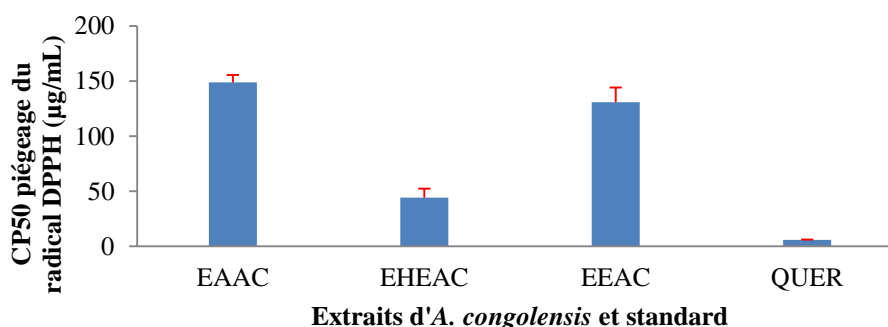


Figure 26 : Concentrations de piégeage 50 du radical DPPH• des extraits et de la quercétine.

EAAC : Extrait aqueux d'*Autranella congolensis* ; *EHEAC* : extrait hydroéthanolique d'*Autranella congolensis* ; *EEAC* : extrait éthanolique d'*Autranella congolensis* ; *QUER* : Quercétine.

Il en ressort que l'activité anti-radicalaire DPPH de l'EHEAC était plus importante que celles des extraits éthanolique et aqueux. Mais cette activité était inférieure à celle de la quercétine : QUER > EHEAC > EEAC > EAAC.

➤ Piégeage du radical NO

L'activité anti-radicalaire des différents extraits d'*A. congolensis* vis-à-vis du radical NO exprimée en CP₅₀ (μg/mL) est présentée dans la figure 27 ci-dessous.

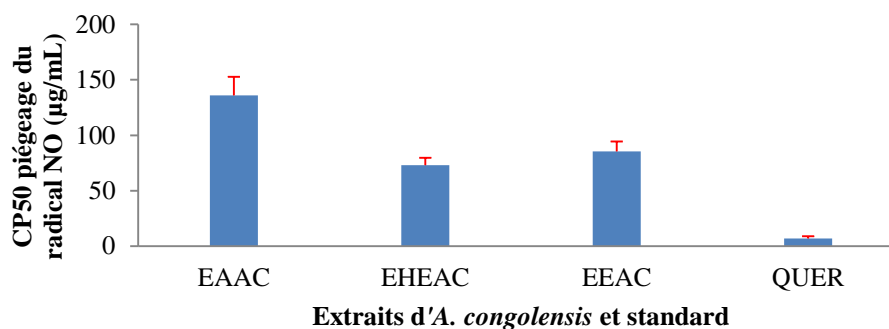


Figure 27: Concentrations de piégeage 50 du radical NO des extraits et de la quercétine.

EAAC : Extrait aqueux d'*Autranella congolensis* ; *EHEAC* : extrait hydroéthanolique d'*Autranella congolensis* ; *EEAC* : extrait éthanolique d'*Autranella congolensis* ; *QUER* : Quercétine

Il en ressort que l'activité anti-radicalaire NO de l'EHEAC était plus importante que celles des extraits éthanolique et aqueux. Mais, cette activité était inférieure à celle de la quercétine : QUER > EHEAC > EEAC > EAAC.

➤ Chélation du fer (Fe^{2+})

L'activité chélatrice des différents extraits d'*A. congolensis* vis-à-vis de l'ion Fe^{2+} exprimée en CP₅₀ est présentée dans la figure 28 ci-dessous.

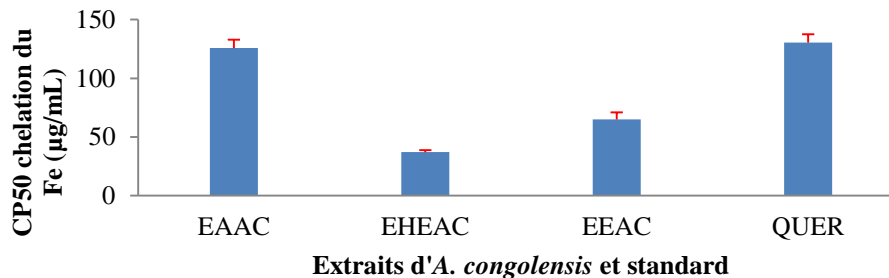


Figure 28: Concentrations de piégeage 50 des ions Fe^{2+} des extraits et de la quercétine.

EAAC : Extrait aqueux d'*Autranella congolensis* ; *EHEAC* : extrait hydroéthanolique d'*Autranella congolensis* ; *EEAC* : extrait éthanolique d'*Autranella congolensis* ; *QUER* : Quercétine

Les résultats indiquent que l'EHEAC a la meilleure efficacité chélatrice suivi de l'extrait aqueux et enfin de l'extrait éthanolique. Les extraits sont plus efficaces que la quercétine. EHEAC > EEAC > EAAC > QUER.

L'extrait hydroéthanolique présente donc le meilleure activité antioxydante *in vitro*. Il a donc été choisi pour la suite de l'étude.

III.1.2. Composés majoritaires de l'EHEAC et effet de l'EHEAC sur les marqueurs du stress oxydant chez un modèle animal de neurotoxicité induit par le chlorure d'aluminium

III.1.2.1. Composés majoritaires de l'EHEAC

Afin d'obtenir des informations sur la nature des principaux constituants de l'extrait hydroéthanolique des écorces d'*A. congolensis* (EHEAC) celui-ci a été analysé par HPLC/SM. Le chromatogramme obtenu (Figure 29) fait apparaître cinq composés majoritaires.

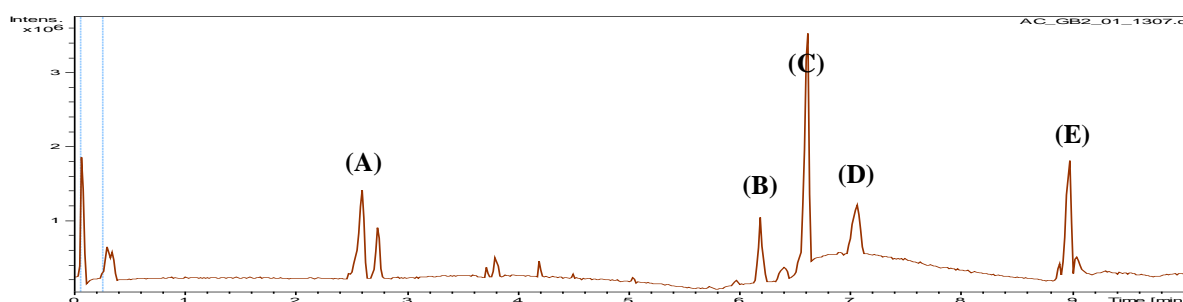


Figure 29 : Profil chromatographique de l'extrait hydroéthanolique d'*A. congolensis*

L'analyse du spectre de masse (Figure 29a), du premier composé (composé le plus polaire) indique un ion moléculaire à m/z 291 $[M+H]^+$ et un ion fils avec l'ion adduit sodique à m/z 313 $([M+Na]^+)$ d'où un poids moléculaire de 290 Da. D'après la littérature, un flavonoïde de même masse, la (+)-catéchine a été précédemment isolé de l'extrait méthanolique des écorces d'*A. congolensis*, laissant supposer que ce composé pourrait être ce flavonoïde.

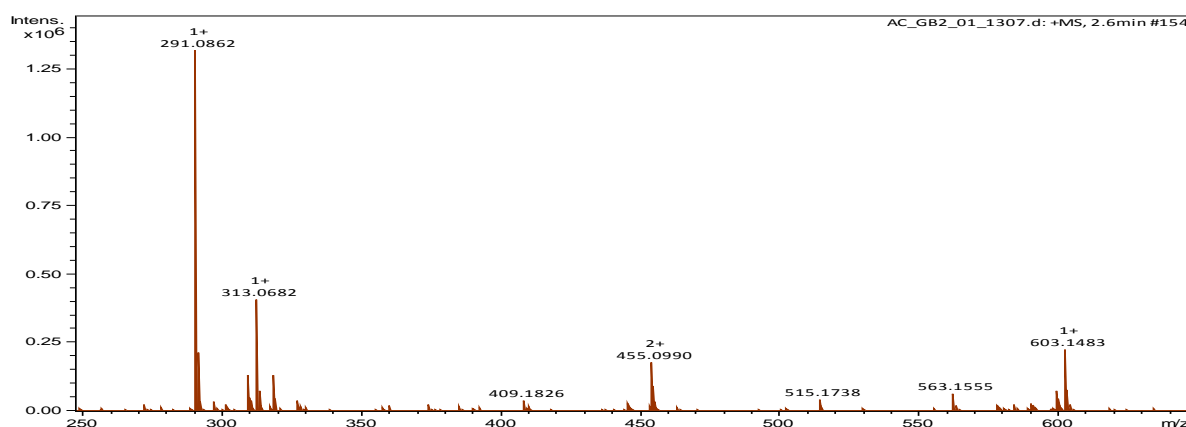


Figure 29 a: Spectre de masse du composé A

L'analyse du spectre de masse du second composé (figure 29b) révèle un ion à m/z 563 $([M+H]^+)$ ainsi qu'un ion fils avec l'ion adduit sodique à m/z 585 $([M+Na]^+)$. La masse

moléculaire de ce composé correspondrait donc à 562 Da. Un composé de même masse moléculaire a été isolé des écorces d'*A. congolensis*, l'acide 24-feruloiltétracosanoïque. Ce composé serait donc identifié comme étant l'acide 24-feruloiltétracosanoïque.

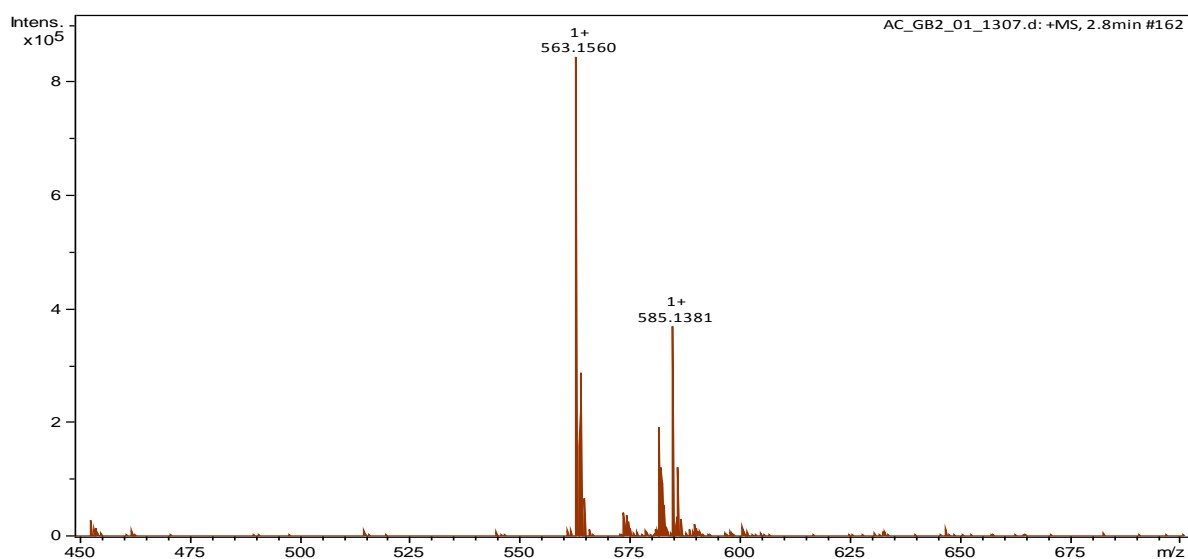


Figure 29 b : Spectre de masse du composé B

L'analyse du spectre de masse du 3^{ème} composé (Figure 29c) révèle un ion à m/z 152 ([M+H]⁺), ainsi qu'un ion fils avec l'ion adduit sodique à m/z 174 ([M+Na]⁺). La masse moléculaire de ce composé correspondrait donc à 151 Da. Dans la littérature, cette masse moléculaire ne correspond à aucun composé déjà isolé dans cette plante ou identifié comme constituant du genre *Mimupsos* ou de la famille des sapotacées.

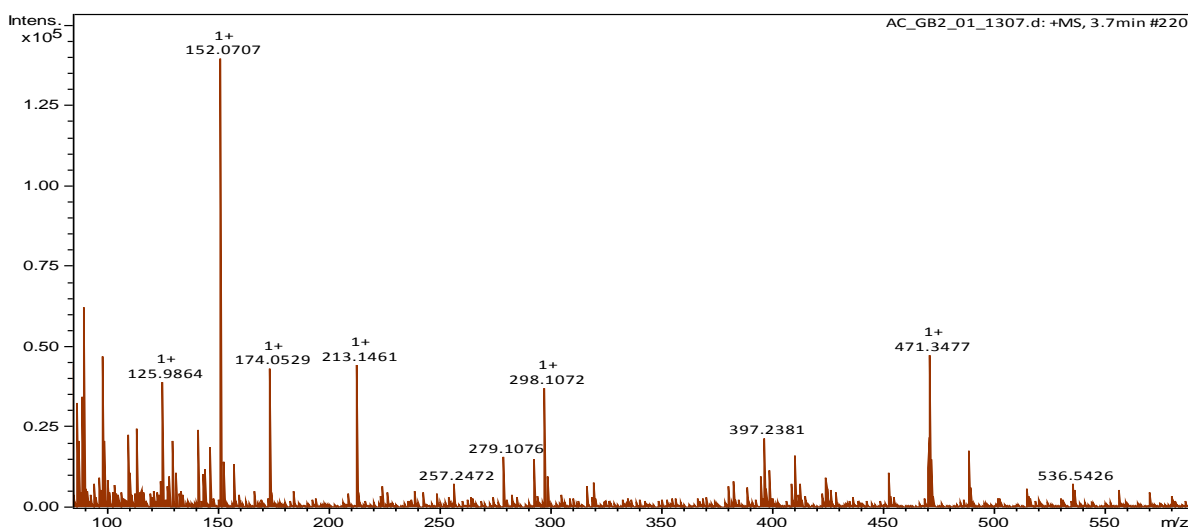


Figure 29 c : Spectre de masse composé C

L'analyse du spectre de masse du 4^{ème} composé (Figure 39d) révèle un ion à m/z 274

($[M+H]^+$), ainsi qu'un ion fils avec l'ion adduit sodique à m/z 296 ($[M+Na]^+$). La masse moléculaire de ce composé correspondrait donc à 273 Da. Dans la littérature, cette masse moléculaire ne correspond à aucun composé déjà isolé dans cette plante ou identifié comme constituant du genre *Mimopsos* ou de la famille des sapotacées.

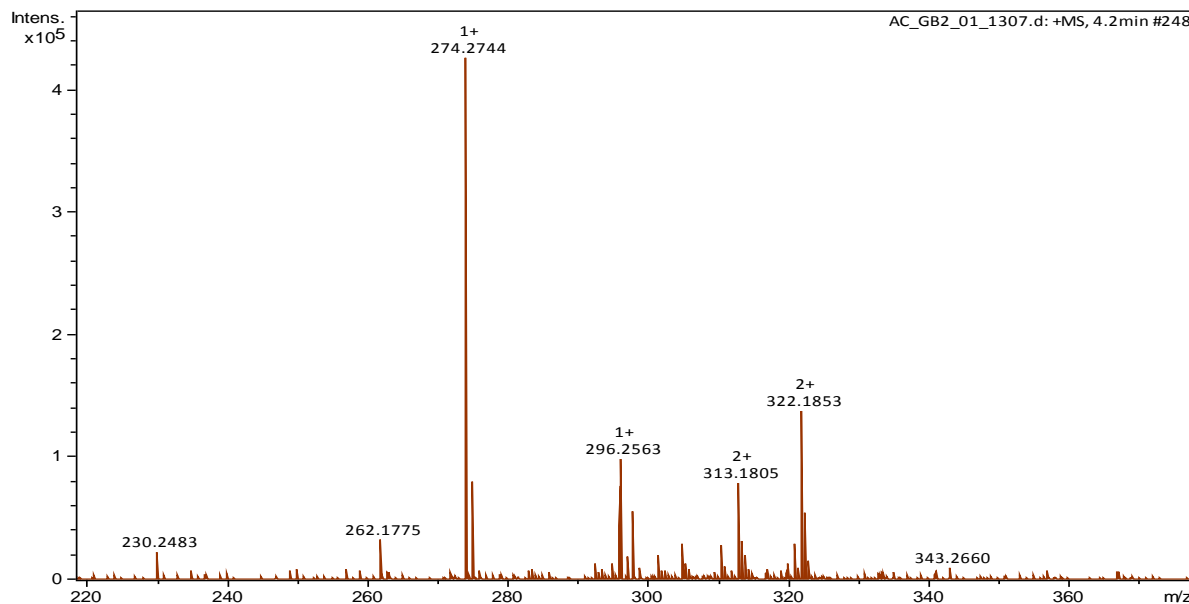


Figure 29 d : Spectre de masse du composé D

L'analyse du spectre de masse du composé 5 révèle un ion à m/z 449 qui correspondrait à la formation d'un adduit avec l'ion sodique $[M+Na]^+$. Ce composé présente également un ion fils m/z 875 ($[2M+Na]^+$). La masse moléculaire de ce composé E correspondrait donc 426 Da. Ce composé serait probablement le taraxérol précédemment isolé de l'écorce de la plante.

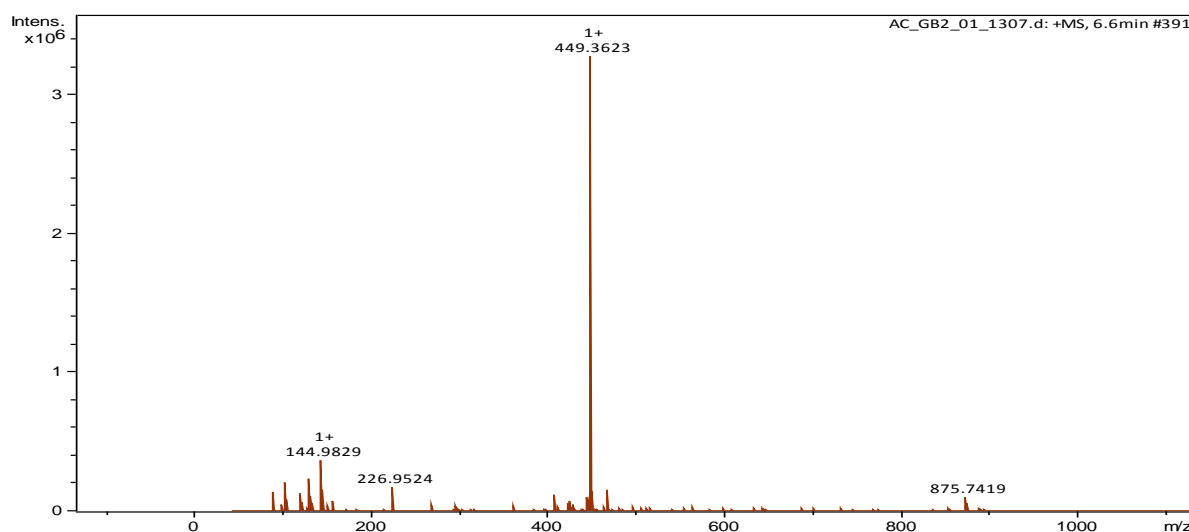


Figure 29 e : Spectre de masse du composé E

Le Tableau XII résume la nature et la formule brute de chaque composé identifié dans

L'EHEAC :

Tableau XII : Composés identifiés par HPLC/MS dans l'extrait hydroéthanolique d'*Austranella congolensis*

Masse molaire	Composés identifiés	Formule brute	Classe de composé
290	Catéchine	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Flavonoïde
562	Acide 24-feruloyltetracosanoïque	C ₃₄ H ₅₆ O ₆	Acide phénolique
426	Taraxérol	C ₃₀ H ₅₀ O	Triterpène pentacyclique

III.1.2.2. Effet de L'EHEAC sur les marqueurs du stress oxydant *in vivo*

Afin mesurer la capacité de l'extrait hydroéthanolique d'*A. congolensis* à prévenir le stress oxydant et d'améliorer le statut antioxydant des rates intoxiquées au chlorure d'aluminium, nous avons mesuré au niveau cérébral et périphérique les concentrations de diènes conjugués, de MDA (marqueurs de la peroxydation lipidique). Nous avons également mesuré les concentrations de protéines carbonylées et thiols protéiques (marqueurs de l'oxydation des protéines). Nous avons enfin mesuré les activités de la SOD, catalase et la GPx. Les résultats sont consignés dans les figures ci-dessous

➤ Au niveau cérébral

▪ Diènes conjugués et malondialdéhyde cérébraux

Les figures 30 et 31 ci-dessous présentent les taux de diènes conjugués (DC) et de malondialdéhyde (MDA) au niveau cérébral.

La formation de DC (figure 30), ainsi que la génération de MDA (figure 31) étaient significativement ($p < 0,05$) augmentées chez le groupe de rates témoin positif (CP) comparées au groupe de rates normales (CN). La co-administration de l'extrait (150 mg/kg) empêchait significativement ($p < 0,05$) la formation des DC et diminuait significativement ($p < 0,05$) la génération de MDA comparées au groupe de rates témoin positif. La vitamine empêchait très peu la formation de DC et ne prévenait pas par conséquent la génération de MDA.

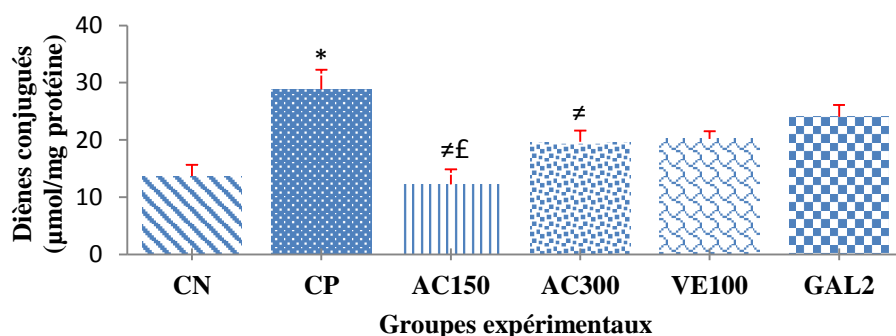


Figure 30 : Effet protecteur de l'EHEAC contre la formation de diènes conjugués dans le cerveau

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; # ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; £ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

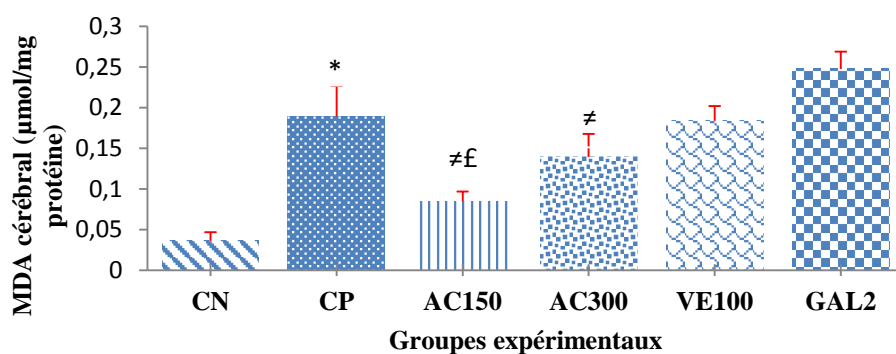


Figure 31: Effet protecteur de l'EHEAC contre la génération de MDA dans le cerveau

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; # ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; £ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

▪ **Protéines carbonylées cérébrales et thiols protéiques cérébrales**

Les figures 32 et 33 ci-dessous présentent les concentrations en protéines carbonylées et thiols protéiques au niveau cérébral.

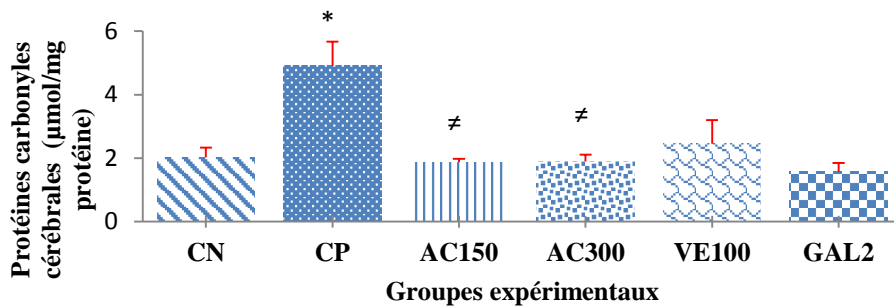


Figure 32: Effet protecteur de l'EHEAC contre l'accumulation des protéines oxydées dans le cerveau

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; \neq ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; \neq ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

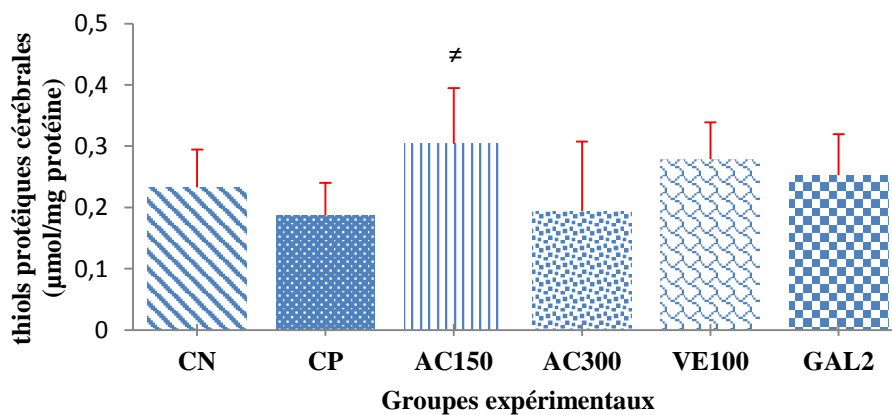


Figure 33: Effet protecteur de l'EHEAC contre l'oxydation des thiols protéiques dans le cerveau

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement

par l' $AlCl_3$; [#]($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; [£]($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

Une accumulation significative ($p < 0,05$) des protéines oxydées (carbonylées) était observée chez le groupe de rates témoin positif (CP) comparée au groupe de rates normales (CN). Aucune variation significative ($p < 0,05$) des taux d'oxydation de thiols protéiques n'était observée entre les groupes de rates témoin positif et normaux. La co-administration de l'EHEAC (150 mg/kg ou 300 mg/kg) empêchait significativement ($p < 0,05$) l'accumulation des protéines oxydées (carbonylées) (61%). A la dose de 150 mg/kg, l'extrait empêchait significativement ($p < 0,05$) l'oxydation des thiols protéiques comparée au groupe de rates témoin positif. La supplémentation en vitamine E diminuait l'accumulation des protéines oxydées mais significativement moins que l'EHEAC.

▪ **Activités de la Superoxyde dismutase (SOD), catalase et la glutathion peroxydase (GPx)**

Les figure 34, 35, 36, présentent les activités de la SOD, catalase et GPx totale au niveau cérébral.

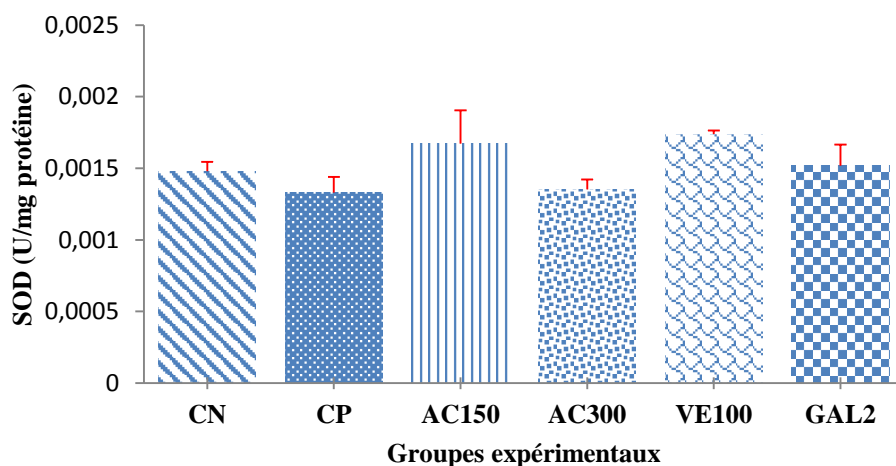


Figure 34: Effet stimulateur de l'EHEAC sur l'activité de la superoxyde dismutase cérébrale
 CN : rates témoins ; CP : $AlCl_3$; AC 150 : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ;
 VE 100 : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; [#]($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; [£]($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

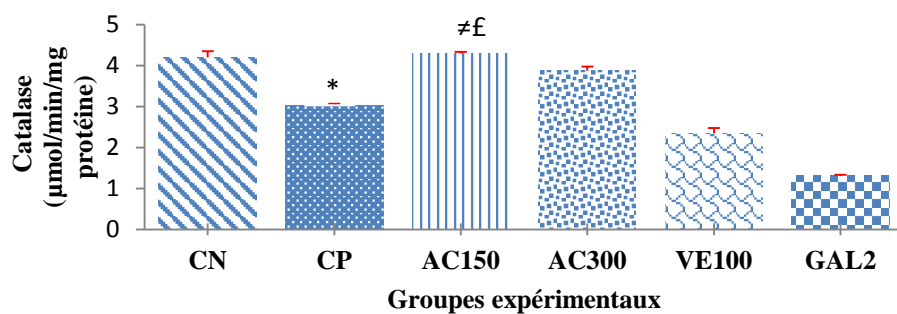


Figure 35: Effet stimulateur de l'EHEAC sur l'activité de la catalase cérébrale

CN : rates témoins ; CP : $AlCl_3$; AC 150 : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; # ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; f ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

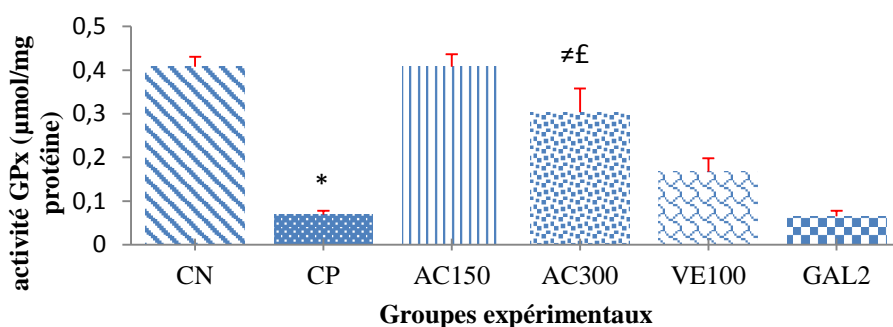


Figure 36 : Effet stimulateur de l'EHEAC sur l'activité de la glutathion peroxydase cérébrale

CN : rates témoins ; CP : $AlCl_3$; AC 150 : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; # ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; f ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

Aucune variation significative ($p < 0,05$) de l'activité de la SOD n'était observée entre les groupes de rates témoin positif et normales. En revanche, une diminution significative ($p < 0,05$) des activités de la catalase et de la GPx était observée chez le groupe de rates témoin positif comparée au groupe de rates normales. La co-administration de l'EHEAC (150 mg/kg ou 300 mg/kg) augmentait significativement ($p < 0,05$) l'activité de la catalase et celle de la GPx comparées au groupe de rates témoin positif. La supplémentation en vitamine E diminuait

davantage l'activité de la catalase et augmentait celle de la GPx mais statistiquement moins que l'EHEAC.

➤ **Effet de l'EHEAC sur les paramètres du stress oxydant au niveau périphérique (plasma et érythrocytes)**

▪ **Capacité antioxydante totale plasma et résistance à l'hémolyse**

Les figures 37 et 38 ci-dessous présente la capacité antioxydante totale plasmatique et la capacité des érythrocytes à résister contre l'

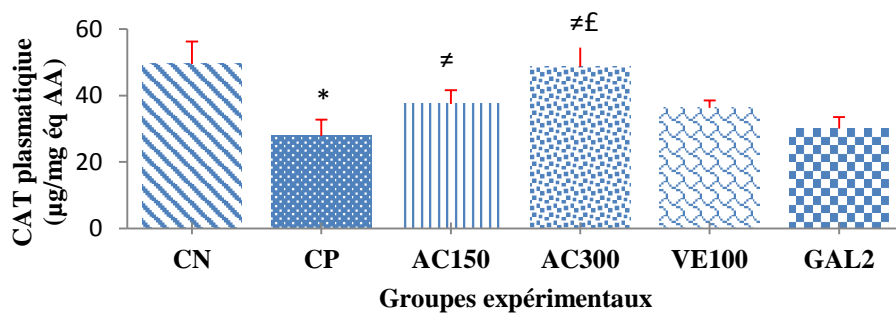


Figure 37 : Effet stimulateur de l'EHEAC sur la capacité antioxydante totale plasmatique

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ;*($p < 0,05$): significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; \neq ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; \neq ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

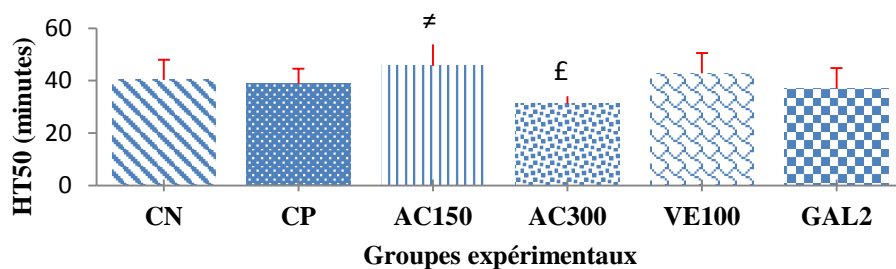


Figure 38 : Effet protecteur de l'EHEAC contre l'hémolyse induite par les radicaux libres

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ;*($p < 0,05$): significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; \neq ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; \neq ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

Le groupe de rates témoin positif présentait une diminution significative de la capacité antioxydante totale plasmatique ($p < 0,05$) et une diminution non significative ($p < 0,05$) de la capacité des érythrocytes à résister à l'hémolyse induite par les radicaux libres comparées au groupe de rates normales. L'administration concomitante de l'EHEAC (150 ou 300 mg/kg) améliorait significativement ($p < 0,05$) la capacité antioxydante totale plasmatique et renforçait la capacité des érythrocytes à lutter contre l'hémolyse induite par les radicaux libres. La supplémentation en vitamine E augmentait la capacité antioxydante totale plasmatique et la capacité des érythrocytes à résister à l'hémolyse. L'effet de l'EHEAC sur ces deux paramètres était statistiquement plus important que celui de la vitamine E.

▪ **Concentrations en diènes conjuguées et malondialdéhyde dans le plasma et les érythrocytes**

Les figures 39, 40, 41 et 42 ci-dessous présentent respectivement les taux de DC et MDA plasmatiques et érythrocytaires.

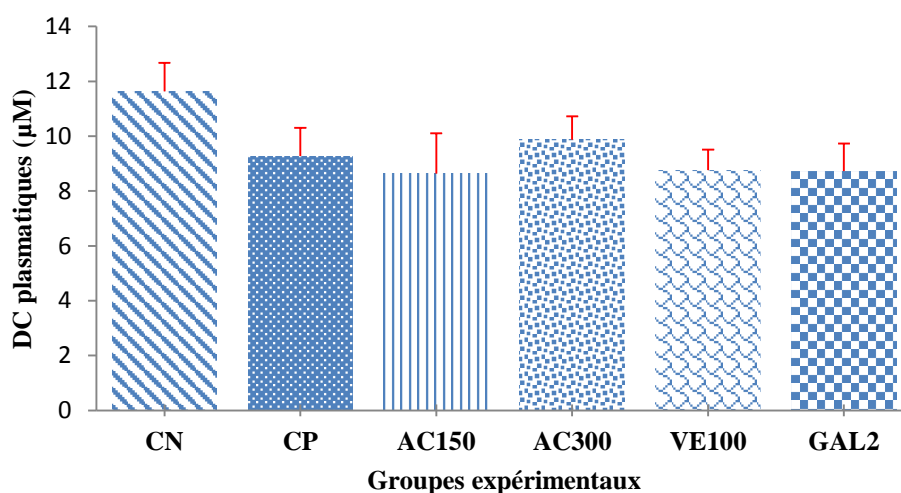


Figure 39: Effet protecteur de l'EHEAC contre la formation des diènes conjugués dans le plasma

CN : rates témoins ; CP : AlCl₃ ; AC 150 : AlCl₃ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : AlCl₃ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : AlCl₃ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : AlCl₃ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur standard ;($p < 0,05$): significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ ;[‡]($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ et celles traitées par l'AlCl₃ + EHEAC ;[£]($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par AlCl₃ + vitamine E OU galantamine et celles traitées par l'AlCl₃ + l'EHEAC.*

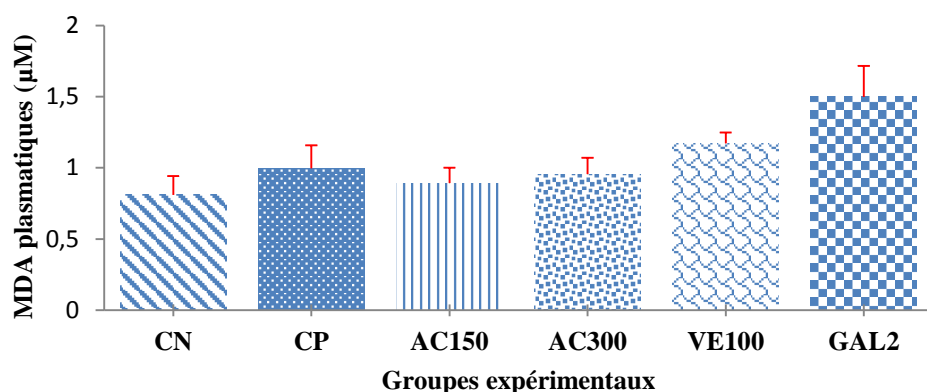


Figure 40: Effet protecteur de l'EHEAC contre la génération de MDA dans le plasma

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; $\#$ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; € ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

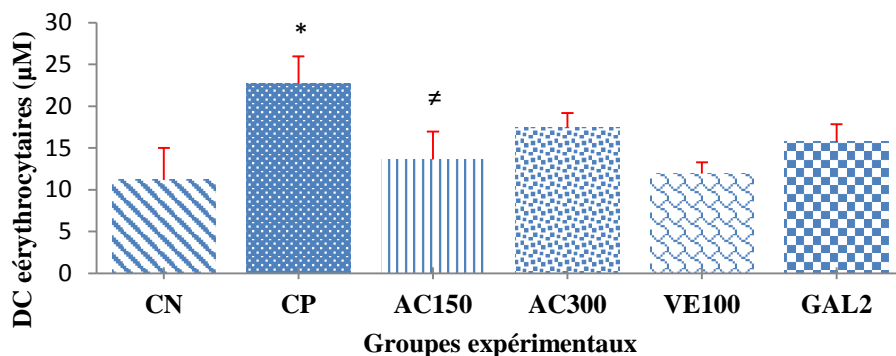


Figure 41: Effet protecteur de l'EHEAC contre la formation des diènes conjugués dans les érythrocytes

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; $\#$ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; € ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

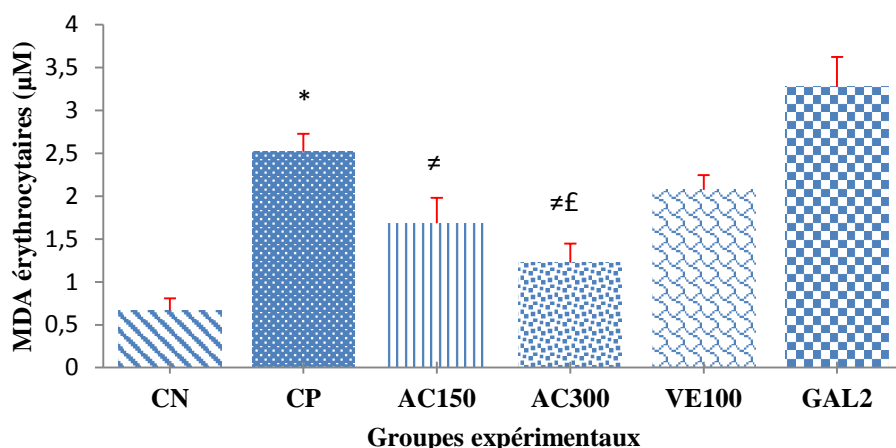


Figure 42: Effet protecteur de l'EHEAC contre la génération de MDA dans les érythrocytes
CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; \neq ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; $\neq f$ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

Aucune variation significative ($p < 0,05$) de la formation des DC et de la génération de MDA n'était observée entre les groupes de rates témoin positif et normales dans le plasma. En revanche, les concentrations de ces deux marqueurs étaient significativement augmentées ($p < 0,05$) dans les érythrocytes. L'administration concomitante de l'EHEAC (150 et 300 mg/kg) réduisait significativement ($p < 0,05$) la formation de DC et par conséquent la génération de MDA comparées au groupe de rates témoin positif dans les érythrocytes. La supplémentation en vitamine E réduisait également la formation de DC et de MDA dans les érythrocytes, mais statistiquement moins que l'EHEAC.

- **Protéines carbonylées plasmatiques et érythrocytaires**

Les figures 43 et 44 ci-dessous présentent les concentrations en protéines carbonylées plasmatique et érythrocytaire.

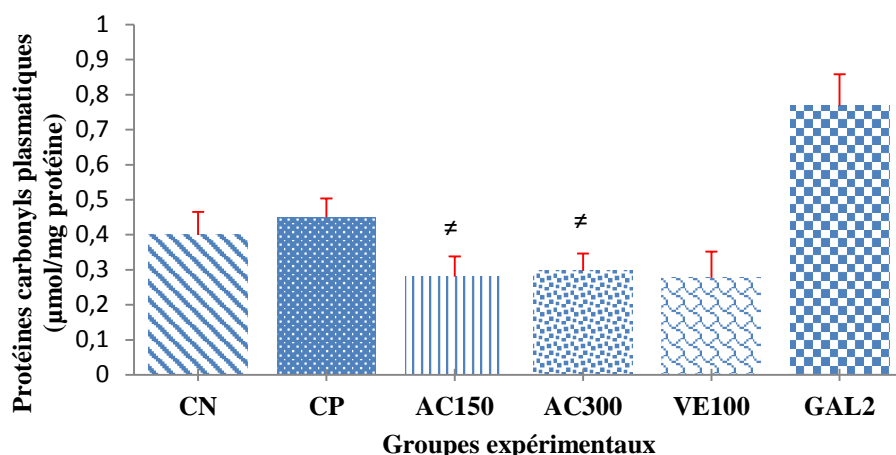


Figure 43: Effet protecteur de l'EHEAC contre l'accumulation des protéines oxydées dans le plasma

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; \neq ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; \neq ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

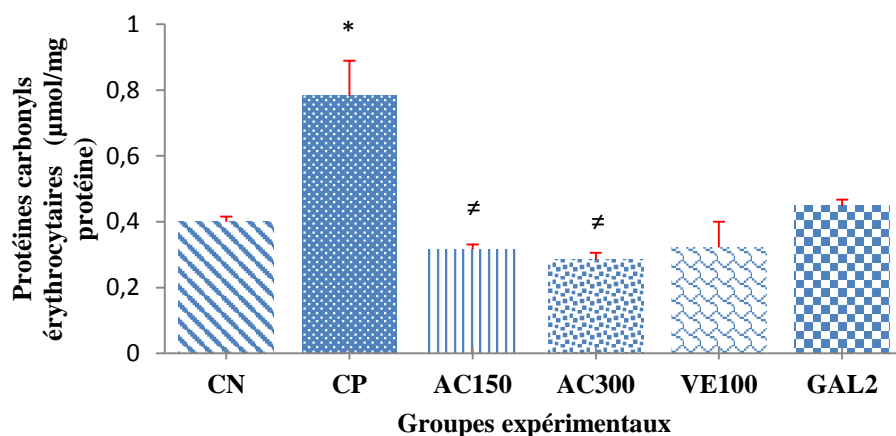


Figure 44: Effet protecteur de l'EHEAC contre l'accumulation des protéines oxydées dans les érythrocytes

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; \neq ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; \neq ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

Au niveau du plasma, aucune variation significative ($p < 0,05$) de l'accumulation des protéines oxydées (protéines carbonylées) n'était observée entre les groupes de rates témoin positif et normales. Dans les érythrocytes en revanche, la concentration de ce marqueur était significativement ($p < 0,05$) augmentée chez le groupe de rates témoin positif. L'administration concomitante de l'EHEAC (150 et 300 mg/kg) réduisait significativement ($p < 0,05$) l'accumulation des protéines oxydées dans le plasma et dans les érythrocytes comparées au groupe de rates témoin positif. La supplémentation en vitamine E réduisait l'accumulation des protéines oxydées dans le plasma et dans les érythrocytes. L'effet de l'EHEAC était statistiquement comparable à celui de la vitamine E.

III.1.3. Effet de l'EHEAC sur la transmission cholinergique, l'homéostasie ionique et les taux de cholestérol et glycérophospholipides cérébraux

III.1.3.1. Effet de l'EHEAC sur l'activité des cholinestérases

Les figures 45, 46 et 47 présentent respectivement les activités de l'acétylcholinestérase, la butyrylcholinestérase, ainsi que le rapport BuChE/AChE au niveau du cerveau.

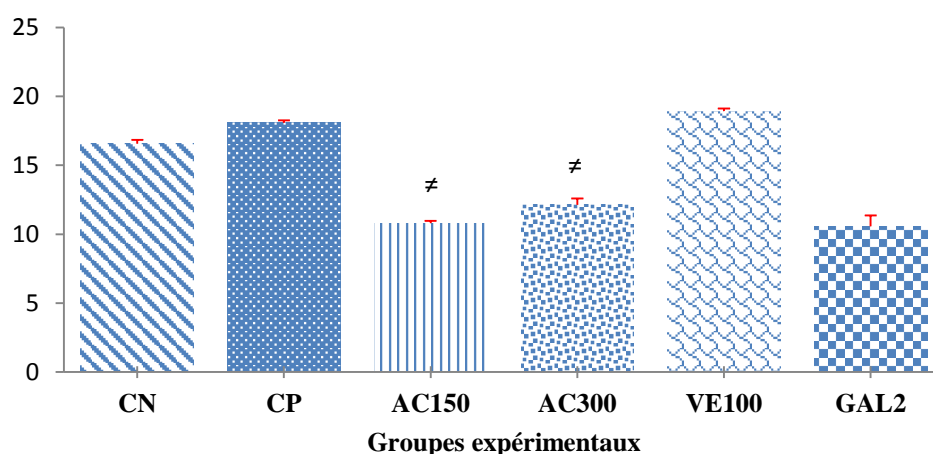


Figure 45: Effet inhibiteur de l'EHEAC sur l'activité de l'acétylcholinestérase cérébrale

CN : rates contrôles ; CP : AlCl₃ ; AC 150 : AlCl₃ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : AlCl₃ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : AlCl₃ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : AlCl₃ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur standard ;($p < 0,05$): significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ ; †($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ et celles traitées par l'AlCl₃ + EHEAC ; ‡($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par AlCl₃ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l'AlCl₃ + l'EHEAC.*

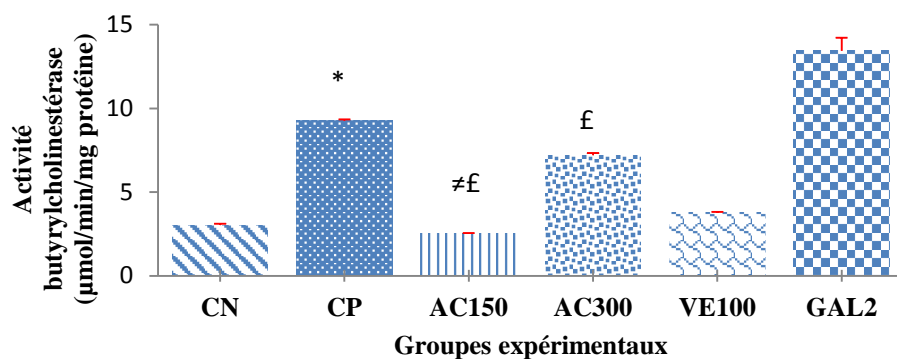


Figure 46: Effet inhibiteur de l'EHEAC sur l'activité de la butyrylcholinestérase cérébrale

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; † ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; ‡ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

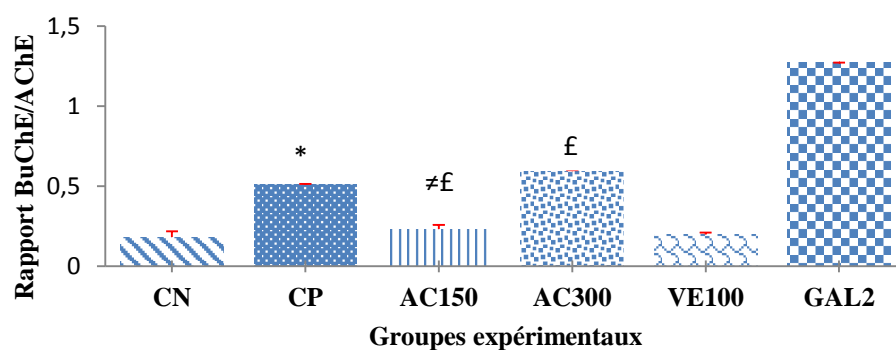


Figure 47: Effet de l'EHEAC sur le maintien du rapport BuChE/AChE cérébral

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; † ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; ‡ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

L'activité de l'acétylcholinestérase ne présentait aucune variation significative ($p < 0,05$) entre les groupes de rates témoin positif et rates normales. En revanche, une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'activité de la butyrylcholinestérase, ainsi que du rapport BuChE/AChE étaient observé chez le groupe de rates témoin positif. L'administration concomitante de l'EHEAC (150 mg/kg) entraînait une diminution significative ($p < 0,05$) des

activités de l'AChE et normalisait l'activité de la BuChE ainsi que du rapport BuChE/AChE comparées au groupe de rates témoin positif. L'administration de la galantamine quant à elle entraînait une inhibition de de l'activité de l'AChE, mais induisait une augmentation de l'activité de la BuChE.

III.1.3.2. Effet de l'EHEAC sur l'homéostasie du calcium

➤ Calcium , magnésium et ratio Calcium/Magnésium (mol/mol)

Les figures 48,49 et 50 ci-dessous présentent respectivement les taux de calcium, magnésium, ainsi que le rapport calcium/magnésium au niveau cérébral.

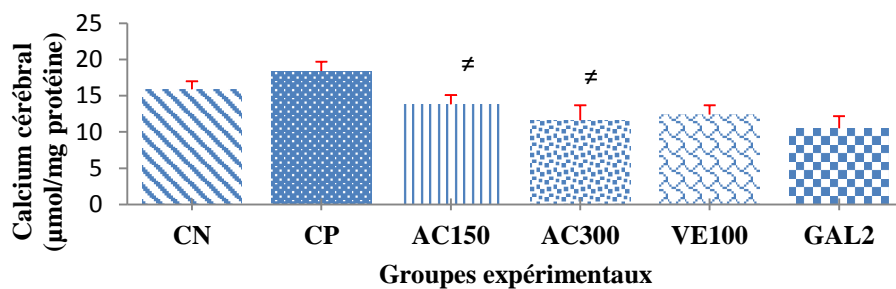


Figure 48: Effet protecteur de l'EHEAC contre l'augmentation du taux de calcium cérébral

CN : rates témoin ; CP : AlCl₃ ; AC 150 : AlCl₃ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : AlCl₃ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : AlCl₃ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : AlCl₃ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur standard ;(p < 0,05) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ ;[≠](p < 0,05) : significativité entre les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ et celles traitées par l'AlCl₃ + EHEAC ;[‡](p < 0,05) : significativité entre les rates traitées par AlCl₃ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l'AlCl₃ + l'EHEAC.*

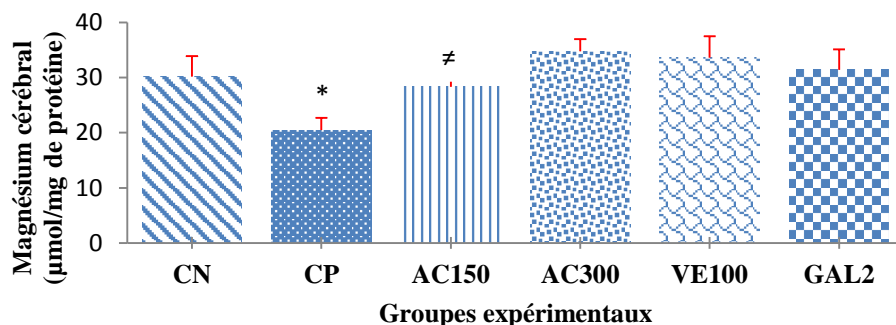


Figure 49: Effet de l'EHEAC sur le maintien du taux de magnésium cérébral

CN : rates témoins ; CP : AlCl₃ ; AC 150 : AlCl₃ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : AlCl₃ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : AlCl₃ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : AlCl₃ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur standard ;(p < 0,05) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ ;[≠](p < 0,05) : significativité entre les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ et celles*

traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; $^{\#}$ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

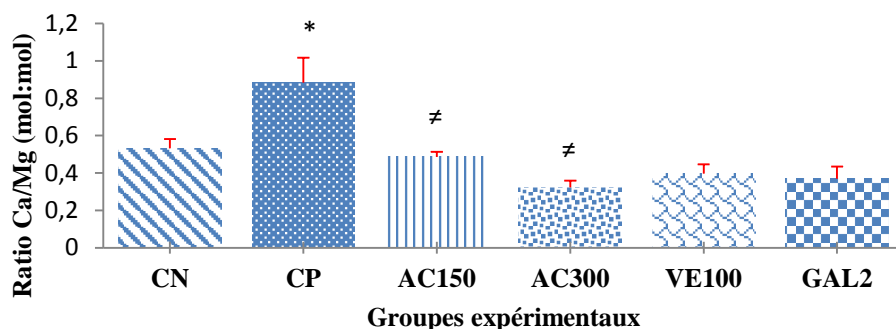


Figure 50: Effet de l'EHEAC sur le maintien du rapport calcium/magnésium cérébral

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; $^{\#}$ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; $^{\#}$ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

Aucune variation significative ($p < 0,05$) de la concentration de calcium cérébral n'était observée entre les groupes de rates témoin positif et normales. En revanche, la concentration de magnésium cérébral diminuait significativement ($p < 0,05$) dans le groupe de rates témoin positif. Le rapport Ca/Mg était également significativement augmenté dans ce groupe. L'administration concomitante de l'EHEAC (150 ou 300 mg/kg) empêchait significativement ($p < 0,05$) l'accumulation du calcium cérébral et favorisait l'entrée du magnésium diminuant ainsi le rapport Ca/Mg comparés au groupe de rates témoin positif. L'administration de la galantamine empêchait l'accumulation du calcium cérébral et augmentait la concentration de magnésium cérébral. L'effet de l'EHEAC était statistiquement comparable à celui de la galantamine.

➤ Effet sur l'activité des ATPases

Les figures 51, 52, et 53 ci-dessous présentent respectivement les activités cérébrales de la Mg^{2+} -ATPase, Ca^{2+} -ATPase et Na^+ , K^+ -ATPase

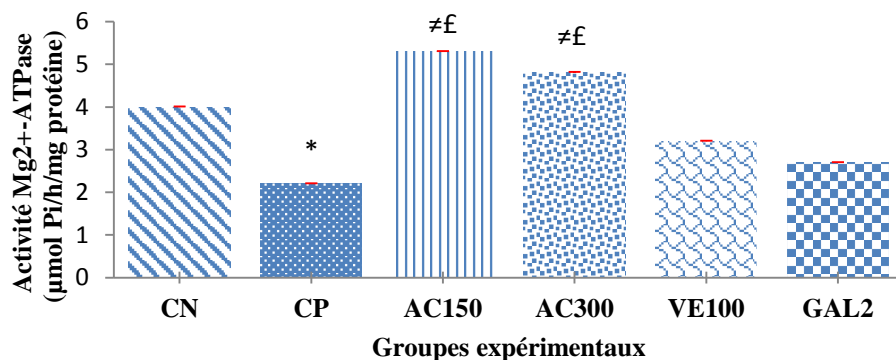


Figure 51: Effet stimulateur de l'EHEAC sur l'activité de la Mg²⁺-ATPase cérébrale

CN : rates témoins ; *CP* : AlCl₃ ; *AC 150* : AlCl₃ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : AlCl₃ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : AlCl₃ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : AlCl₃ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur standard ; * (*p* < 0,05) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ ; † (*p* < 0,05) : significativité entre les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ et celles traitées par l'AlCl₃ + EHEAC ; £ (*p* < 0,05) : significativité entre les rates traitées par AlCl₃ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l'AlCl₃ + l'EHEAC.

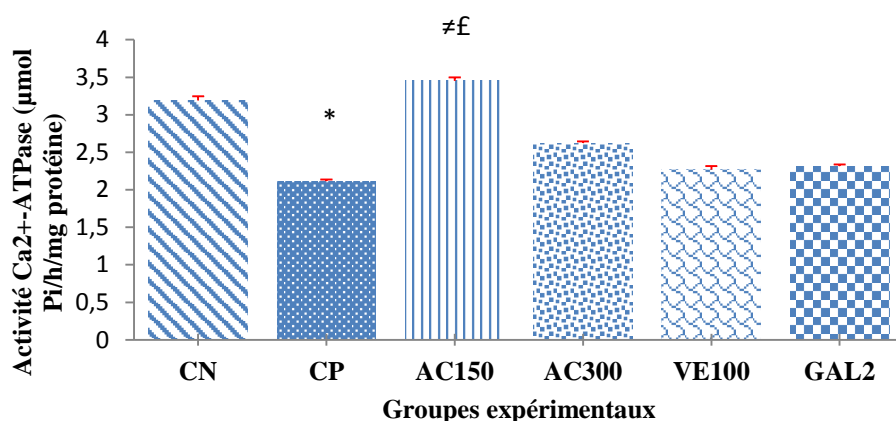


Figure 52: Effet stimulateur de l'EHEAC sur l'activité de la Ca²⁺-ATPase cérébrale

CN : rates témoins ; *CP* : AlCl₃ ; *AC 150* : AlCl₃ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : AlCl₃ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : AlCl₃ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : AlCl₃ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur standard ; * (*p* < 0,05) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ ; † (*p* < 0,05) : significativité entre les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ et celles traitées par l'AlCl₃ + EHEAC ; £ (*p* < 0,05) : significativité entre les rates traitées par AlCl₃ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l'AlCl₃ + l'EHEAC.

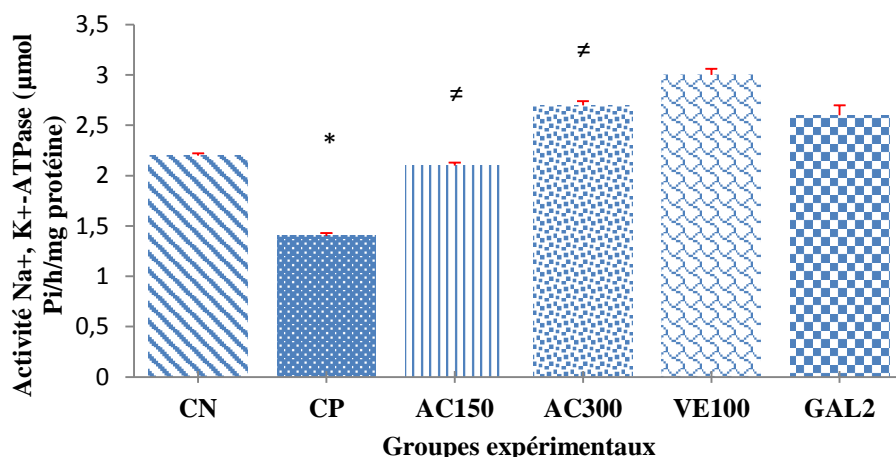


Figure 53: Effet stimulateur de l'EHEAC sur l'activité de la Na⁺, K⁺-ATPase cérébrale

CN : rates témoins ; *CP* : AlCl₃ ; *AC 150* : AlCl₃ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : AlCl₃ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : AlCl₃ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : AlCl₃ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur standard ;*(*p* < 0,05) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ ;[≠](*p* < 0,05) : significativité entre les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ et celles traitées par l'AlCl₃ + EHEAC ;[≠](*p* < 0,05) : significativité entre les rates traitées par AlCl₃ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l'AlCl₃ + l'EHEAC.

Les activités de la Ca²⁺-ATPase, de la Na⁺, K⁺-ATPase et de la Mg²⁺-ATPase étaient significativement (*p* < 0,05) diminuées chez le groupe de rates témoin positif comparées aux rates normales. La co-administration de l'EHEAC (150 et 300 mg/kg) augmentait significativement (*p* < 0,05) les activités de ces trois ATPases comparée au groupe de rates témoin positif. L'administration de la galantamine augmentait avait un effet important uniquement sur l'activité de Na⁺, K⁺-ATPase.

III.1.3.3: Effet sur les taux de cholestérol, phospholipides, plasmalogènes et triglycérides

➤ Au niveau cérébral

Les figures 54, 55, 56 et 57 ci-dessous présentent respectivement les teneurs en cholestérol, phospholipides, plasmalogènes et ainsi que le ratio molaire Cholestérol/Phospholipides.

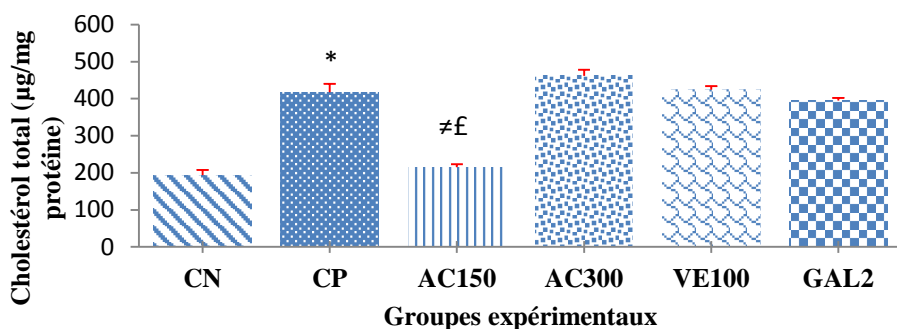


Figure 54: Effet protecteur de l'EHEAC contre l'accumulation du cholestérol au niveau cérébral

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; # ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; £ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

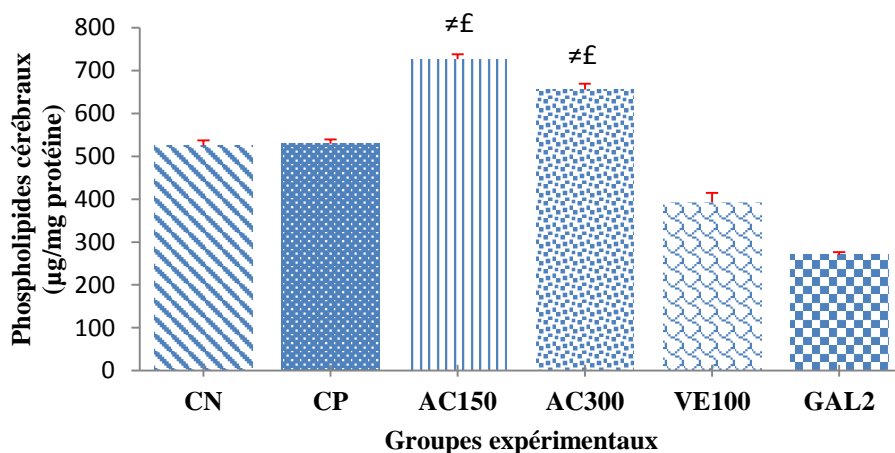


Figure 55: Effet protecteur de l'EHEAC sur les phospholipides cérébraux

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; # ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; £ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

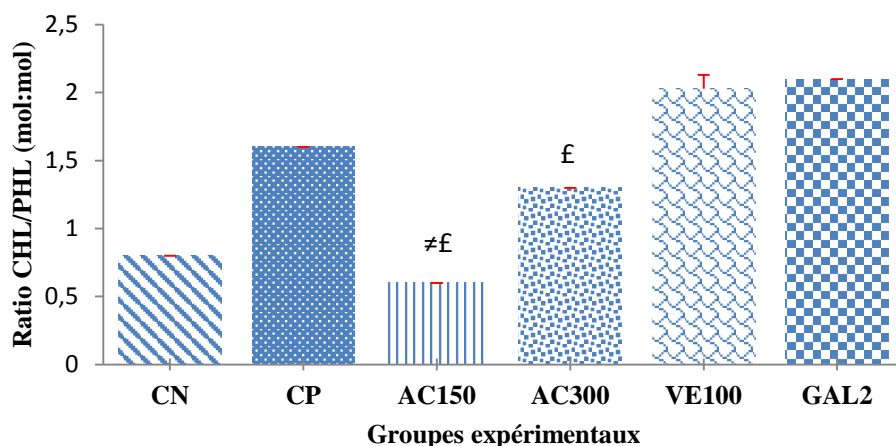


Figure 56: Effet de l'EHEAC sur le maintien du ratio molaire Cholestérol/Phospholipides cérébral

CN : rates contrôles ; CP : AlCl₃ ; AC 150 : AlCl₃ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : AlCl₃ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : AlCl₃ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : AlCl₃ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur standard ;(*p* < 0,05): significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ ; ≠f (*p* < 0,05) : significativité entre les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ et celles traitées par l'AlCl₃ + EHEAC ; f (*p* < 0,05) : significativité entre les rates traitées par AlCl₃ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l'AlCl₃ + l'EHEAC.*

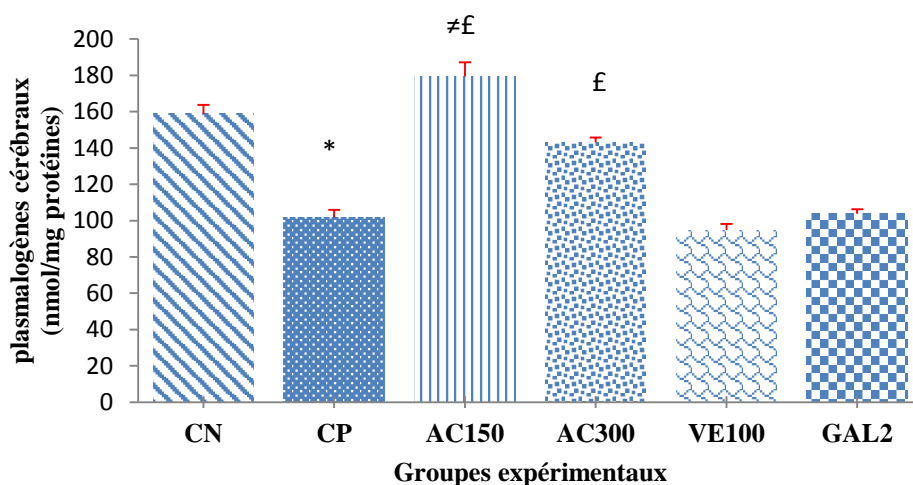


Figure 57: Effet protecteur de l'EHEAC sur les plasmalogènes cérébraux

CN : rates témoins ; CP : AlCl₃ ; AC 150 : AlCl₃ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : AlCl₃ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : AlCl₃ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : AlCl₃ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur standard ;(*p* < 0,05): significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ ; ≠f (*p* < 0,05) : significativité entre les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ et celles traitées par l'AlCl₃ + EHEAC ; f (*p* < 0,05) : significativité entre les rates traitées par AlCl₃ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l'AlCl₃ + l'EHEAC.*

Le taux de cholestérol total cérébral ainsi que le ratio molaire CH/PHL étaient

significativement ($p < 0,05$) augmentés chez le groupe de rates témoin positif comparés au groupe de rates normales. Une diminution significative ($p < 0,05$) du niveau de plasmalogènes totaux dans le cerveau était également observée chez le groupe de rate témoin positif. La co-administration de l'EHEAC (150 mg/kg) empêchait significativement ($p < 0,05$) l'accumulation du cholestérol cérébral et augmentait significativement ($p < 0,05$) les niveaux de phospholipides totaux et maintenait le niveau de plasmalogènes totaux comparés au groupe de rates témoin positif. L'EHEAC permettait également de rétablir le ratio molaire CH/PHL. L'administration de la galantamine ou de la vitamine E accentuait la baisse du niveau de phospholipides totaux et n'empêchait pas l'accumulation du cholestérol ou la baisse du niveau de plasmalogènes.

➤ **Au niveau plasmatique et érythrocytaire**

Les figures 58, 59 et 60 ci-dessous présentent respectivement les teneurs en cholestérol total et en triglycérides dans le plasma, ainsi que les teneurs en plasmalogènes dans le plasma et les érythrocytes.

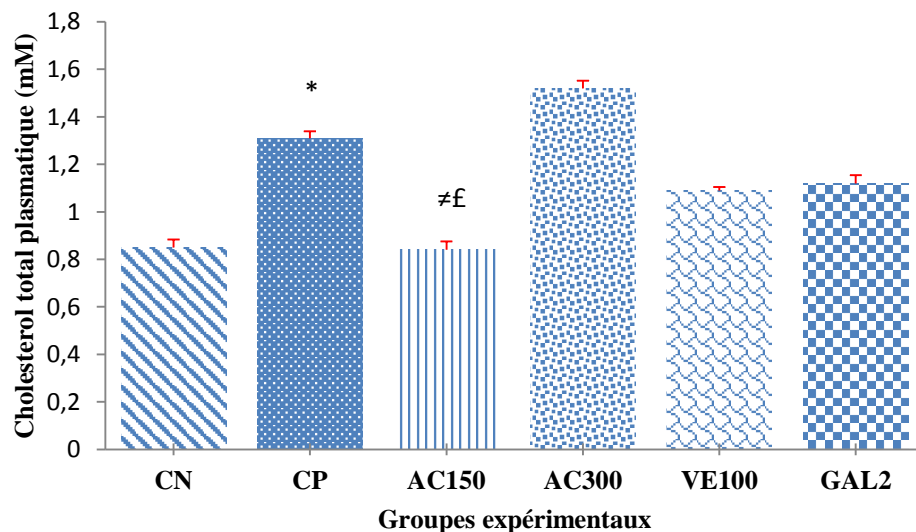


Figure 58: Effet antihypercholestérolémiant de l'EHEAC

CN : rates témoins ; CP : $AlCl_3$; AC 150 : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ;($p < 0,05$): significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$;#($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; ‡($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.*

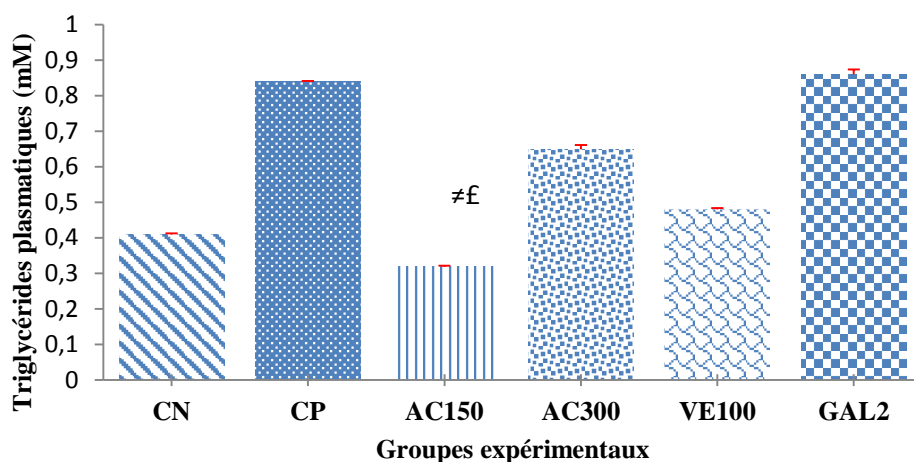


Figure 59: Effet antihyperlipidémiant de l'EHEAC

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; # ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; £ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

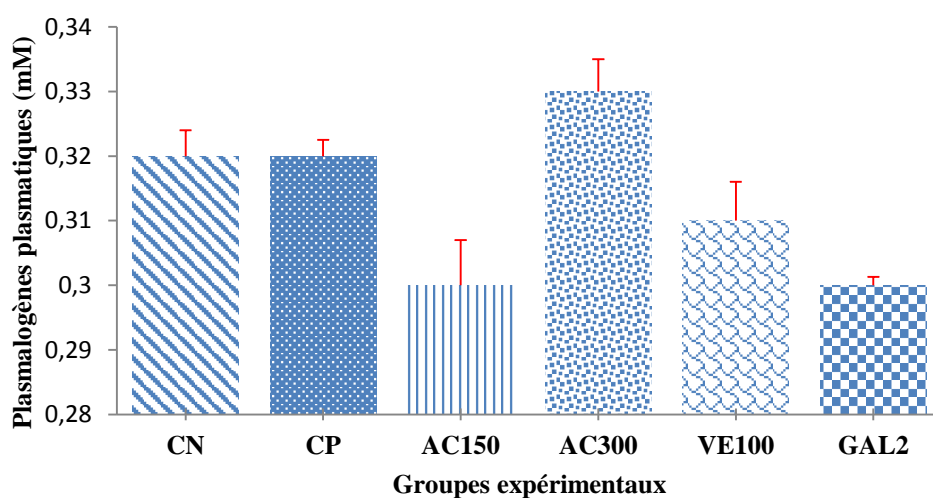


Figure 60: Effet protecteur de l'EHEAC sur les plasmalogènes plasmatiques

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; # ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; £ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

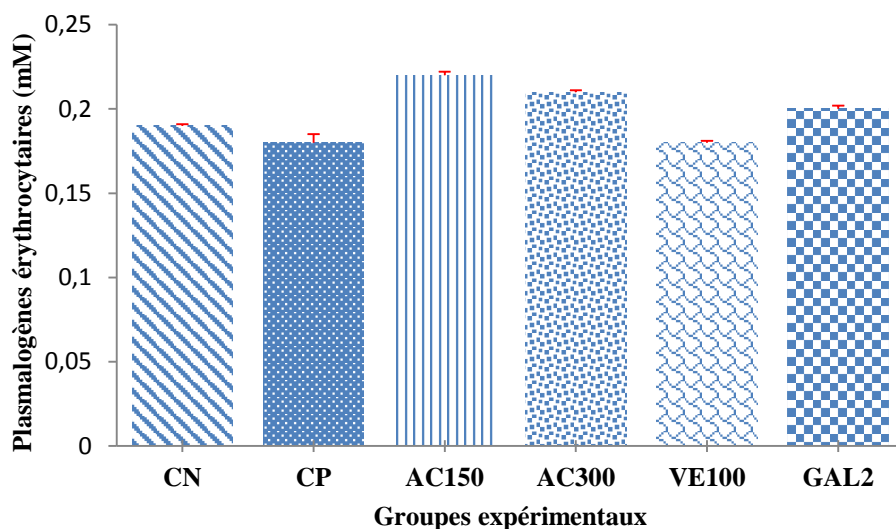


Figure 61: Effet protecteur de l'EHEAC sur les plasmalogènes érythrocytaires

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; # ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; † ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

Les taux de cholestérol et de triglycérides plasmatiques étaient significativement ($p < 0,05$) augmentés chez le groupe de rates témoin positif comparés au groupe de rates normales. En revanche, les niveaux de plasmalogènes plasmatiques et érythrocytaires restaient inchangés dans tous les groupes. La co-administration de l'EHEAC (150 mg/kg) maintenait significativement ($p < 0,05$) les niveaux de cholestérol et triglycérides plasmatiques. La supplémentation en vitamine E diminuait le taux de triglycérides et cholestérol, mais, significativement moins que l'EHEAC.

III.1.3.4. Effet de l'EHEAC sur le taux de glucose et les activités de la LDH et de l'aconitase

➤ Glucose cérébral et plasmatique

Les figures 62 et 63 ci-dessous présentent respectivement les teneurs en glucose cérébral et plasmatique

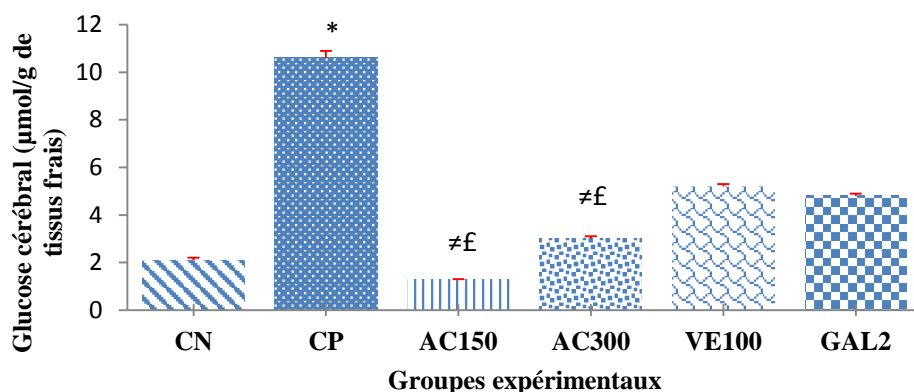


Figure 62: Effet stimulateur de l'EHEAC sur l'utilisation du glucose cérébral

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; $\neq f$ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; $\neq f$ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

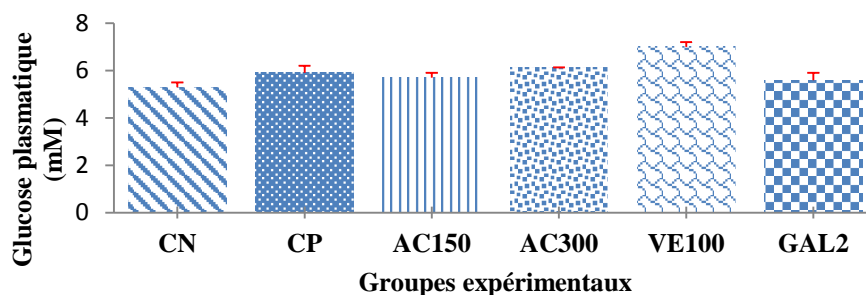


Figure 63: Effet hypoglycémiant de l'EHEAC

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; $\neq f$ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; $\neq f$ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

Le taux de glucose cérébral était significativement ($p < 0,05$) augmenté chez le groupe de rate témoin positif comparé au groupe de rates normales. En revanche, les taux de glucose plasmatiques ne variaient pas entre les différents groupes. L'administration de l'EHEAC (150 mg ou 300 mg/kg) réduisait significativement ($p < 0,05$) le taux de glucose cérébral comparé au groupe de rate témoin positif. La supplémentation en vitamine E réduisait le taux de glucose

cérébral mais statistiquement moins que l'EHEAC.

➤ **Activité de la lactate déshydrogénase cérébrale (LDH) et de l'aconitase**

Les figures 64 et 65 ci-dessous présentent respectivement les activités de la LDH et de l'aconitase au niveau cérébral.

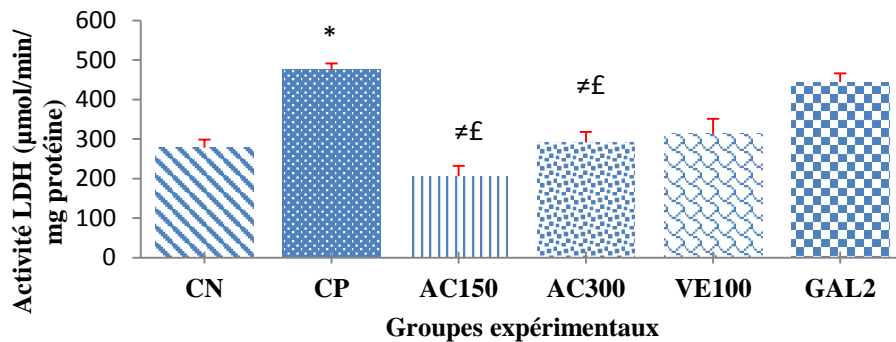


Figure 64: Effet inhibiteur de l'EHEAC sur l'activité de LDH

CN : rates témoins ; CP : $AlCl_3$; AC 150 : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ;*($p < 0,05$): significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; $\neq f$ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; $\neq f$ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

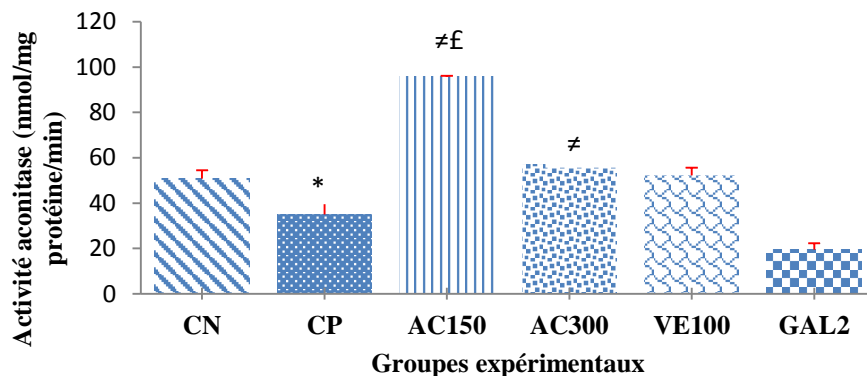


Figure 65: Effet stimulateur de l'EHEAC sur l'activité de l'aconitase cérébrale

CN : rates témoins ; CP : rates traitées uniquement à l' $AlCl_3$; AC 150 : rates traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : rates traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : rates traitées par l' $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : rates traitées par l' $AlCl_3$ + galanthamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ;*($p < 0,05$): significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; $\neq f$ ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; $\neq f$ ($p < 0,05$).

L'activité de la LDH était significativement élevée ($p < 0,05$), tandis que l'activité de la

l'aconitase était significativement ($p < 0,05$) diminuée chez le groupe de rates témoin positif comparée aux rates normales. L'administration concomitante de l'EHEAC (150 et 300 mg/kg) diminuait significativement ($p < 0,05$) l'activité de la LDH et augmentait significativement ($p < 0,05$) l'activité de l'aconitase. La supplémentation en vitamine E diminuait, l'activité de la LDH, et augmentait l'activité de l'aconitase mais statistiquement moins que l'EHEAC.

II.1.4. Effets de l'EHEAC sur les modifications structurales de l'hippocampe et sur les paramètres neurocomportementaux

III.1.4.1. Modifications structurales de l'hippocampe

Les lésions tissulaires ainsi que la perte neuronale au niveau de l'hippocampe des rates ont été étudiées par marquages des tissus à l'hématoxyline-éosine et au crésyl violet.

III.1.4.1.1. Cartographie des lésions à l'hématoxyline-éosine

➤ Au niveau du Gyrus Denté (GD)

La figure 66 ci-dessous présente les microphotographies du gyrus denté de l'hippocampe des rates après coloration à l'hématoxyline-éosine.

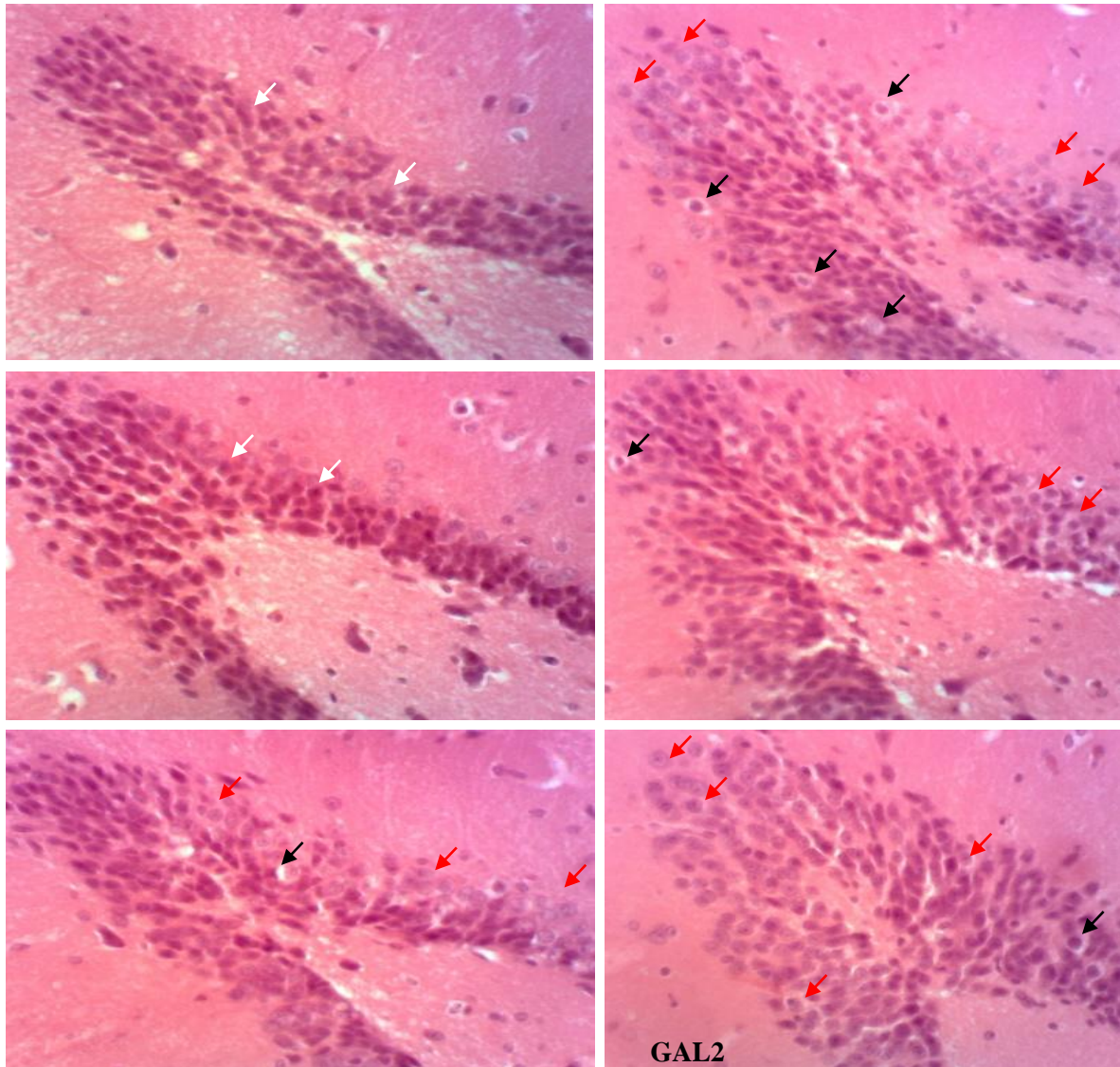


Figure 66 : Microphotographies du gyrus denté (x200) de l'hippocampe après coloration à l'hématoxyline-éosine. *Les flèches en blanc indiquent les cellules granulaires d'aspect sombre, les flèches en noir indiquent les marques de cytolyse, les flèches en rouge indiquent les cellules granulaires d'aspect pâle*

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg)

L'analyse histologique du gyrus denté montrait chez le groupe de rates normales des couches de cellules granulaires compactes d'aspect sombre. Chez le groupe de rates témoin positif, il était observé une désorganisation des couches de cellules granulaires avec des cellules d'aspect pâle, moins compactes et moins denses. On notait également des marques de cytolyse cellulaire et des zones de perte cellulaire. Quant au groupe de rates traitées concomitamment à l'EHEAC (150 mg/kg), il était observé une organisation de l'architecture du gyrus denté

similaire à celle du groupe de rates normales. Le groupe de rates ayant reçues la vitamine E présentait une architecture du gyrus denté organisée, mais avec des couches de cellules granulaires moins denses dans certaines zones et d'aspect pâle et la présence des marques de cytolysse cellulaire. Celles ayant reçues la galantamine montraient des couches de cellules granulaires avec des noyaux d'aspect pâle et des marques de cytolysse cellulaire.

➤ **Au niveau de la Corne d'Ammon 1 (CA1)**

La figure 67 présente les microphotographies du CA1 de l'hippocampe après coloration à l'hématoxyline-éosine.

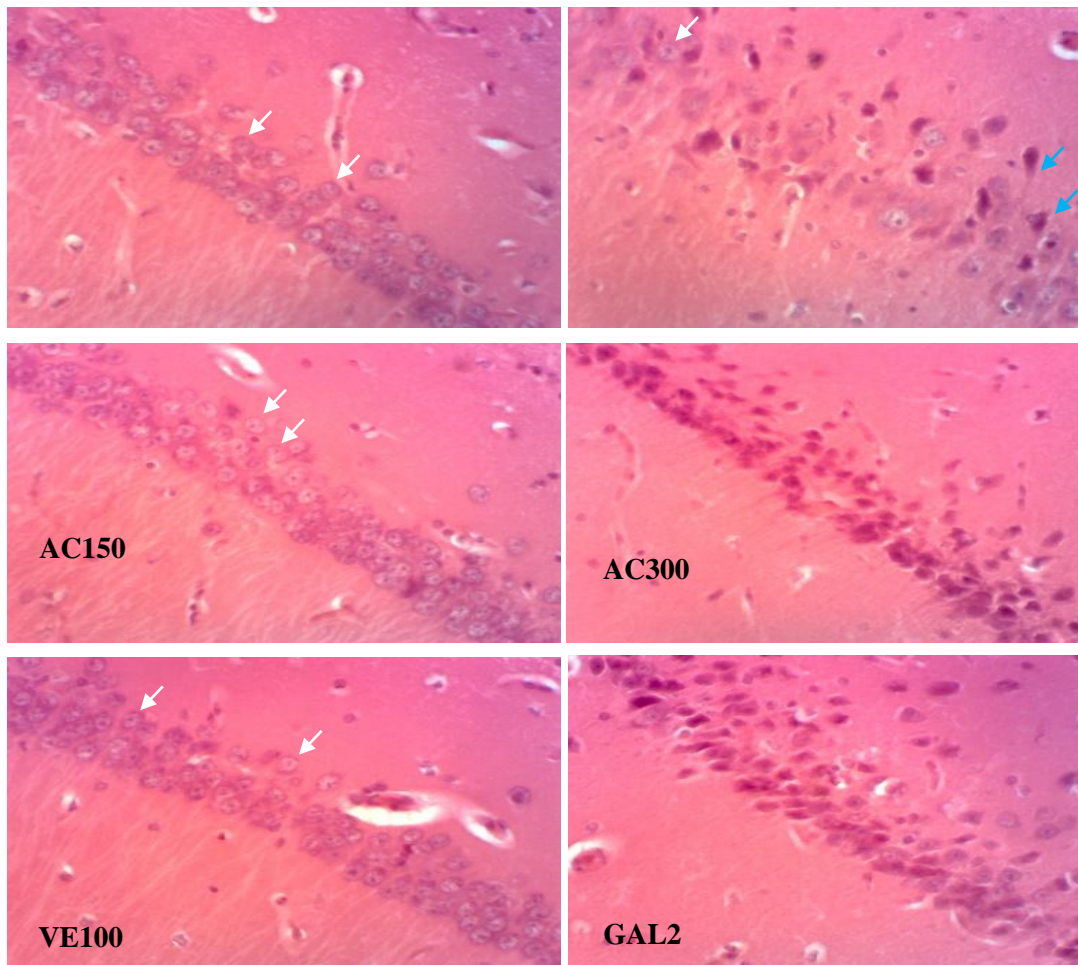


Figure 67 : Microphotographies de la corne d'Ammon 1 (CA1) (X200) de l'hippocampe après coloration à l'hématoxyline-éosine. *Les flèches en blanc indiquent des neurones pyramidaux avec noyau vésiculaire, les flèches en bleu montrent les dégénérescences cellulaires.*

CN : rates témoins ; CP : AlCl₃ ; AC 150 : AlCl₃ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : AlCl₃ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : AlCl₃ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : AlCl₃ + galantamine (2 mg/kg)

Une architecture organisée de la région CA1 et des couches de neurones pyramidaux avec noyaux vésiculaires étaient observées chez le groupe de rates normales. Chez le groupe de rates témoin positif il était observé une architecture désorganisée de la CA1 avec présence de dégénérescence neurofibrillaires. Les groupes de rates qui recevaient l'EHEAC (150 mg/kg) ou la vitamine E montraient une microstructure de la CA1 proche du groupe des rates normales. Le groupe des rates ayant reçues la galantamine présentaient plutôt une diminution de l'épaisseur des couches de neurones pyramidaux.

➤ **Au niveau de la Corne d'Ammon 2 (CA2)**

La figure 68 présente les microphotographies du CA2 de l'hippocampe après coloration à l'hématoxyline-éosine.

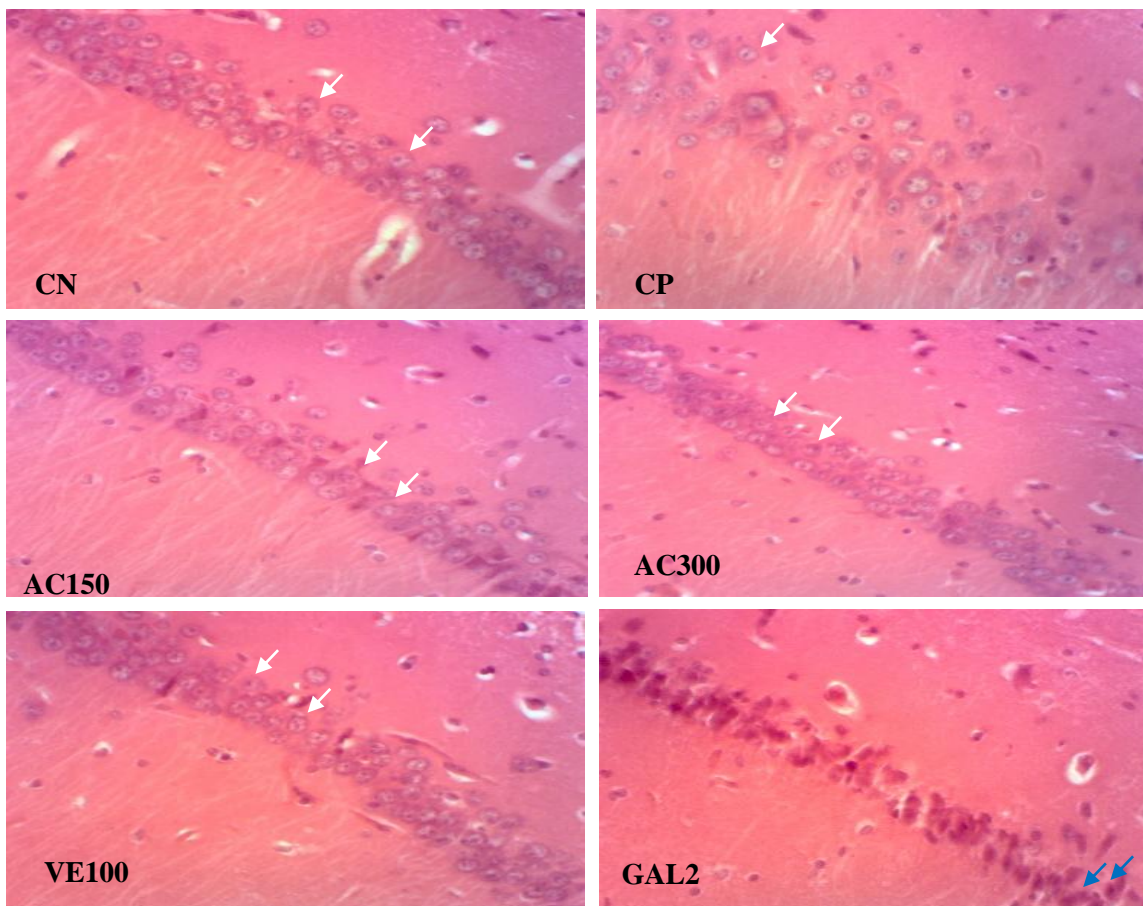


Figure 68 : Microphotographies de la corne d'Ammon 2 (CA2) (X200) de l'hippocampe après coloration à l'hématoxyline-éosine. *Les flèches en blanc indiquent des neurones pyramidaux avec noyau vésiculaire, les flèches en bleu montrent les dégénérescences cellulaires.*

CN : rates témoins ; CP : AlCl₃ ; AC 150 : AlCl₃ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : AlCl₃ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : AlCl₃ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : AlCl₃ + galantamine (2 mg/kg)

Il était observé chez le groupe de rates normales une architecture organisée de la région CA2 avec des couches de neurones pyramidaux à noyaux vésiculaires. Chez le groupe de rates témoin positif, les couches de neurones pyramidaux étaient irrégulières avec diminution de leur densité. Les rates qui recevaient concomitamment l'EHEAC (150 mg/kg) ou à la vitamine E montraient une microstructure de la CA2 également proche de celle des rates contrôles. Il était noté la présence de dégénérescences cellulaires chez les rates ayant reçues la galantamine.

➤ **Au niveau de la Corne d'Ammon 3 (CA3)**

La figure 69 présente les microphotographies du CA3 de l'hippocampe après coloration à l'hématoxyline-éosine

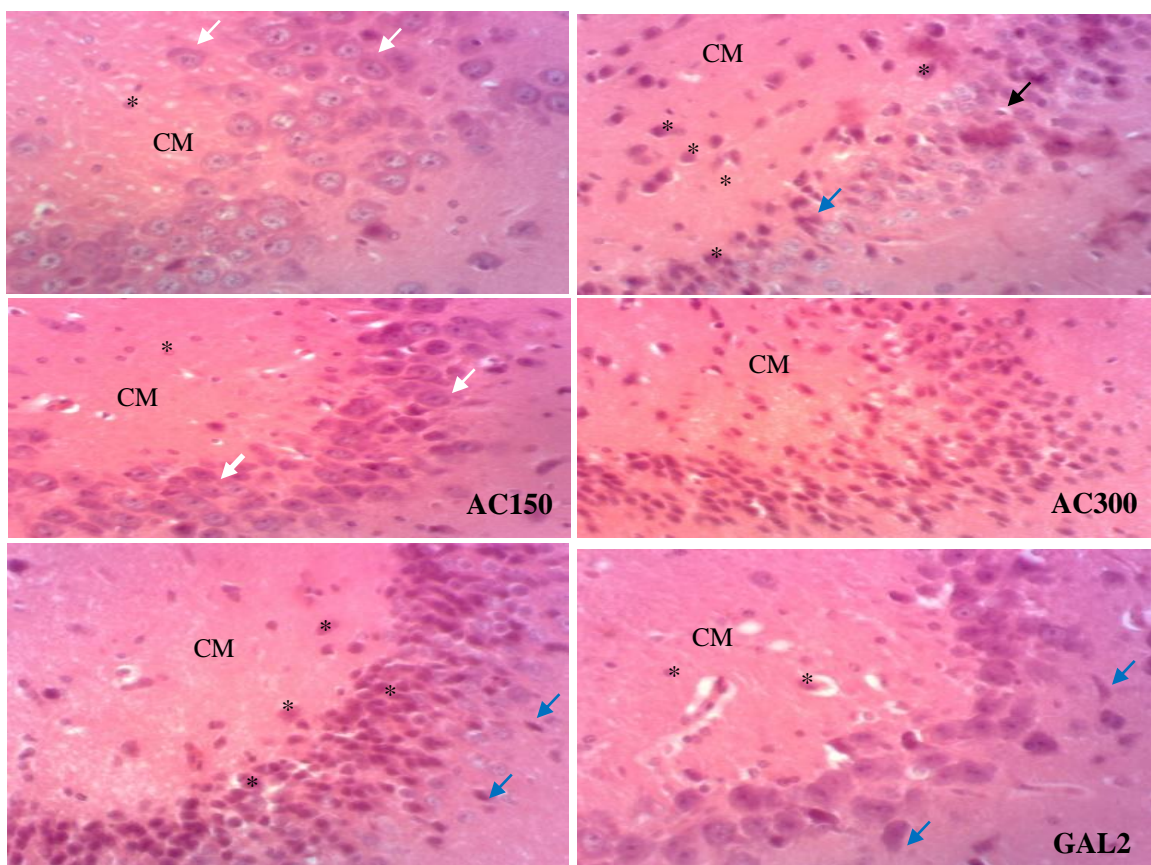


Figure 69 : Microphotographies de la corne d'Ammon 3 (CA3) (X200) de l'hippocampe après coloration à l'hématoxyline-éosine. *Les flèches en blanc indiquent des neurones pyramidaux larges, les flèches en noir indiquent les cytolyses alors que les flèches en bleu montrent les dégénérescences cellulaires, CM : couche moléculaire, * : cellules gliales.*

CN : rates témoins ; CP : AlCl₃ ; AC 150 : AlCl₃ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : AlCl₃ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : AlCl₃ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : AlCl₃ + galantamine (2 mg/kg)

Il était observé chez le groupe de rates normales des couches de neurones pyramidaux larges avec noyau vésiculaire, avec une couche moléculaire (CM) montrant peu de cellules gliales. Chez le groupe de rates témoin positif les couches de neurones pyramidaux étaient rétrécies, avec une cytololyse marquée, la présence de dégénérescences cellulaires et prolifération des cellules gliales dans la CM. Le groupe de rates essais (150 mg/kg d'EHEAC) montrait une microstructure de la CA3 également proche du groupe des rates normales. La CA3 des rates ayant reçues la vitamine E présentaient des couches de neurones pyramidaux rétrécies, avec une forte augmentation du nombre de cellules gliales et une dégénérescence cellulaire. Il était noté également la présence de dégénérescences cellulaires chez les rates ayant reçues la galantamine.

III.1.4.1.2. Analyse morphométrique des structures de l'hippocampe au crésyl violet

➤ La corne d'Ammon 1

La figure 70 présente les microphotographies du CA1 de l'hippocampe après coloration au Crésyl violet

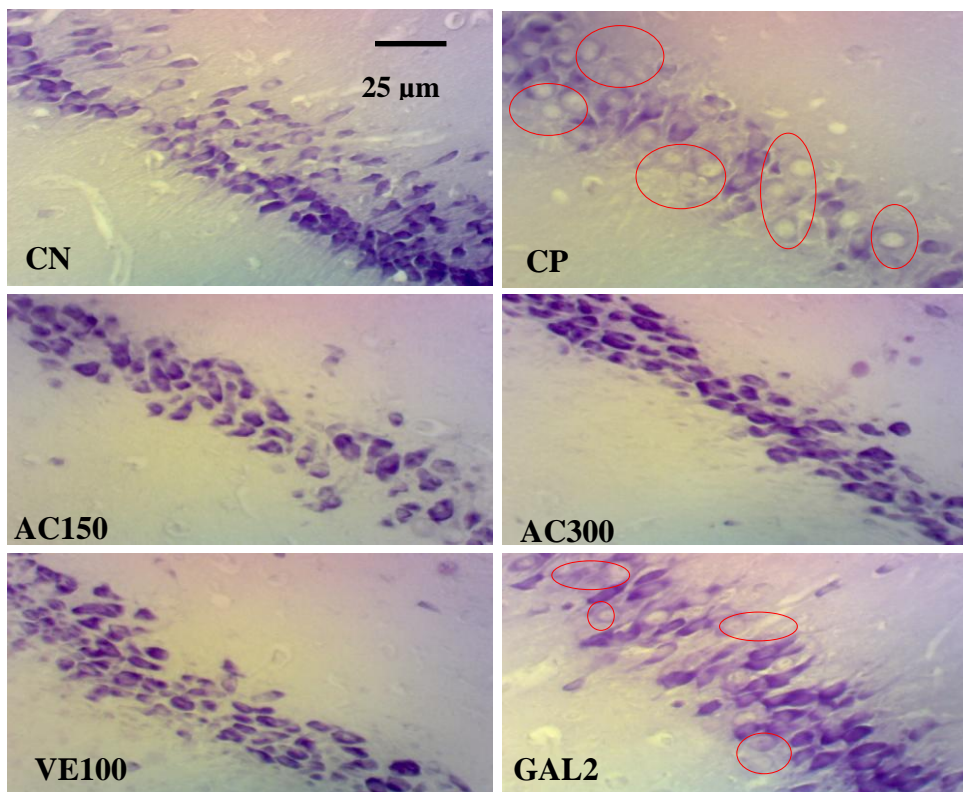


Figure 70: Microphotographies des cornes d'Ammon 1 (X200) de l'hippocampe ; Coloration au Crésyl violet. *Les cercles indiquent les zones non marquées ou de pertes neuronales.*

CN : rates témoins ; CP : l'AlCl₃ ; AC 150 : AlCl₃ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : AlCl₃ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : AlCl₃ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : AlCl₃ + galanthamine (2 mg/kg)

L'analyse morphométrique comparative du groupe de rates témoin positif et du groupe de rates normales dans la zone CA1, révélait une diminution significative de la densité de marquage de marquage chez les rates intoxiquées. Ce résultat indique une atrophie tissulaire, conséquence d'une perte plus importante des neurones. A l'inverse, le groupe de rates essais (150 mg/kg EHEAC) révélait une augmentation de la densité de marquage indiquant une diminution de la dégénérescence ou de la perte neuronale comparé au groupe de rates témoin positif. Les groupes de rates références présentaient également une augmentation de la densité de marquage (vitamine E), néanmoins quelques zones de pertes neuronales étaient observées chez les rates ayant recues la galantamine.

➤ **La corne d'Ammon 3**

La figure 71 présente les microphotographies du CA3 de l'hippocampe après coloration Crésyl violet.

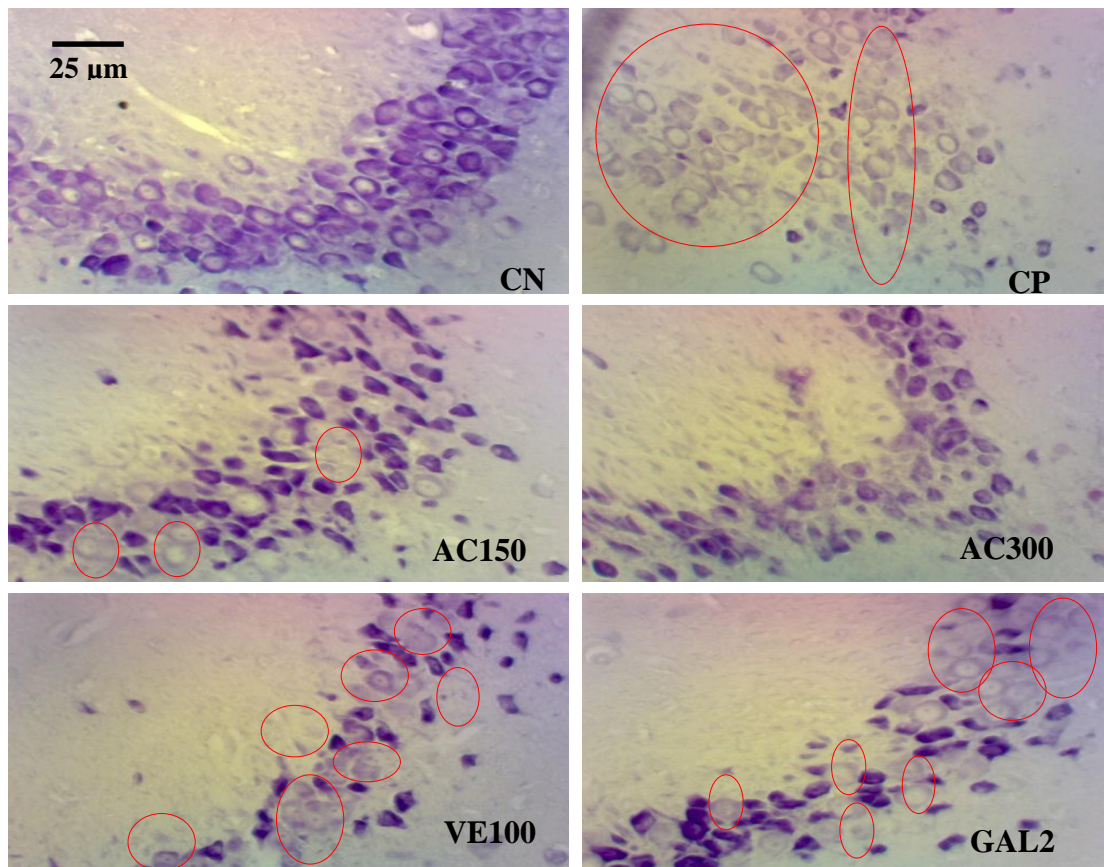


Figure 71: Microphotographies des cornes d'Ammon 3 (X200) de l'hippocampe ; Coloration au Crésyl violet. *Les cercles indiquent les zones non marquées ou de pertes neuronales*
CN : rates témoins ; **CP :** $AlCl_3$; **AC 150 :** $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; **AC 300 :** $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ;
VE 100 : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; **GAL 2 :** $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg)

L'analyse morphométrique comparative du groupe de rates témoin positif et le groupe de rates normales dans la zone CA3, révélait une quasi absence de marquage des corps de Nissl ou de noyau cellulaire chez les rates intoxiquées indiquant une forte dégénérescence neuronale. A l'inverse, le groupe de rates essais (150 mg/kg EHEAC), révélait une augmentation de la densité de marquage dont une diminution de la dégénérescence ou de la perte neuronale comparé au groupe de rate témoin positif. Les groupes de rates références (vitamine E ou à la galantamine) présentaient une très faible densité de marquage, indiquant un processus neurodégénératif plus rapide ou une perte neuronale plus importante.

III.1.4.2. Effet de l'EHEAC sur les paramètres neurocomportementaux

III.1.4.2.1. Effet sur la mémoire de reconnaissance d'objet

Les rates ont été soumises aux évaluations comportementales tout au long de l'expérimentation. Quatre semaines après l'administration du $AlCl_3$, les rates du groupe témoin positif passaient moins de temps à explorer le nouvel objet dans le test de reconnaissance d'objet. On notait une diminution significative de l'indice de reconnaissance (IR) chez ces dernières comparée au groupe de rates normales (Figure 72). Cette diminution était également observée après sept semaines (Figure 73) mais restait statistiquement ($p < 0,05$) pareille (Figure 74). Par conséquent, les altérations de la mémoire de reconnaissance à court-terme (MRCT) induites par le $AlCl_3$ sont sensiblement les mêmes à quatre et à sept-semaines post-administration. Contrairement à la MRCT, quatre semaines après administration du $AlCl_3$, la mémoire de reconnaissance à long-terme (MRLT) était conservée chez les rates (Figure 75). Les valeurs des IR obtenues étaient statistiquement ($p < 0,05$) comparables entre le groupe de rates normales et le groupe de rates témoin positif (Figure 75). Cependant, après sept semaines la MRLT était perturbée chez ces rates (Figure 76). L'administration concomitante de l'EHEAC (150 ou 300 mg/kg) potentialisait les capacités de mémoire de reconnaissance à court-terme des rates (Figures 72 et 73). En effet, leur exploration du nouvel objet était très significativement supérieur ($p < 0,05$) à la valeur théorique d'une exploration due au hasard et à celle du groupe des rates témoins (Figures 72 et 73). Les valeurs de IR obtenues étaient statistiquement ($p < 0,05$) comparables à celles de la vitamine E et de la galantamine. Toutefois, les valeurs des IR des semaines quatre et sept étaient statistiquement ($p < 0,05$) similaires chez les groupes de rates essais ce qui n'était pas le cas des groupes de rates références (vitamine E et galantamine) (Figure 74). Chez ces derniers les valeurs des IR diminuaient significativement ($p < 0,05$) entre les semaines quatre et sept (Figure 74). l'EHEAC (150 ou 300 mg/kg) préservait également les capacités de mémoire de reconnaissance à long-terme des rates (Figures 76 et 77).

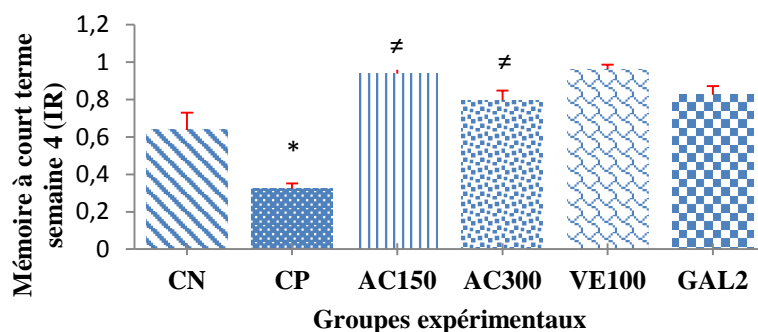


Figure 72: Préservation de la mémoire à court terme par l'EHEAC (semaine 4)

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; \neq ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; \neq ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par l' $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

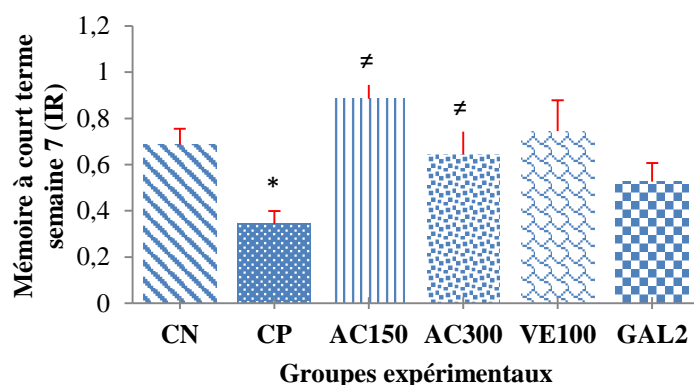


Figure 73: Préservation de la mémoire à court terme par l'EHEAC (semaine 7)

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; \neq ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; \neq ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par l' $AlCl_3$ + vitamine E ou galanthamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

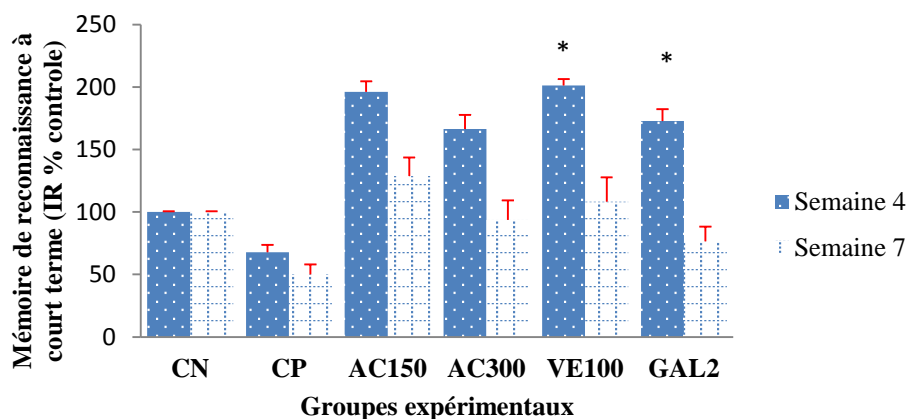


Figure 74: Comparaison des indices de reconnaissance en % contrôle des semaines 4 et 7 dans chaque groupe (mémoire à court terme)

CN : rates témoins ; *CP* : l' $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * $p < 0,05$: significativité entre IR semaine 4 et IR semaine 7 du groupe respectif.

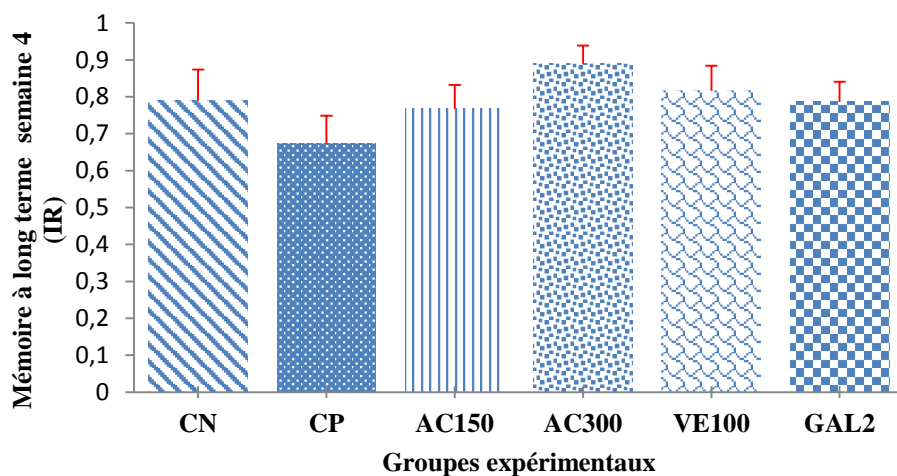


Figure 75: Préservation de la mémoire de reconnaissance à long terme par l'EHEAC (semaine 4)

CN : rates témoins ; *CP* : $AlCl_3$; *AC 150* : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; *AC 300* : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; *VE 100* : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; *GAL 2* : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * ($p < 0,05$) : significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; # ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; † ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par l' $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

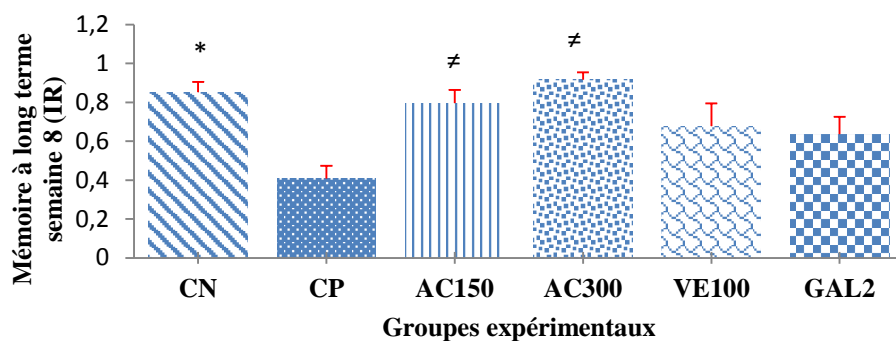


Figure 76: Préservation de la mémoire de reconnaissance à long terme par l'EHEAC (semaine 7)

CN : rates témoins; CP : $AlCl_3$; AC 150 : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ;*($p < 0,05$): significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$; \neq ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ; \neq ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par l' $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

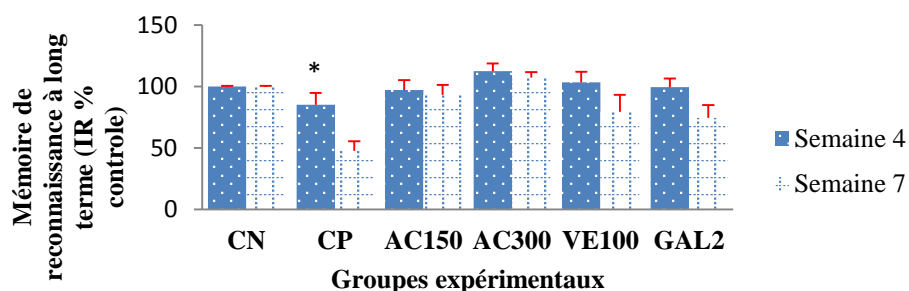


Figure 77: Comparaison des indices de reconnaissance en % contrôle des semaines 4 et 7 dans chaque groupe (mémoire à long terme)

CN : rates témoins ; CP : $AlCl_3$; AC 150 : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ; * $p < 0,05$: significativité entre IR semaine 4 et IR semaine 7 du groupe respectif.

III.1.4.2.2. Effet sur l'apprentissage et la mémoire spatiale

➤ Après 5 semaines d'intoxication au chlorure d'aluminium

La mémoire spatiale et l'apprentissage ont été évalués en utilisant le test de la piscine de Morris. Après cinq semaines, toutes les rates étaient capables d'apprendre la localisation de la plateforme de façon équivalente (Figure 78). Cependant, un effet significatif ($p < 0,05$) de l'administration concomitante de l'EHEAC (150 mg/kg) était observé sur l'efficacité d'apprentissage. L'analyse de cette interaction a révélé une différence entre les rates témoin

positif et celles traitées par l'EHEAC (150 mg/kg) au deuxième, troisième et quatrième jours d'apprentissage. Le jour du test de mémorisation, tous les groupes expérimentaux avaient passé un temps significativement plus important dans le quadrant cible ($p < 0,05$, premier histogramme) que dans les autres quadrants (moyenne du temps passé dans les autres quadrants, deuxième histogramme) (Figure 79). Ceci indique que tous les groupes ont pu se souvenir de la localisation passée de la plateforme.

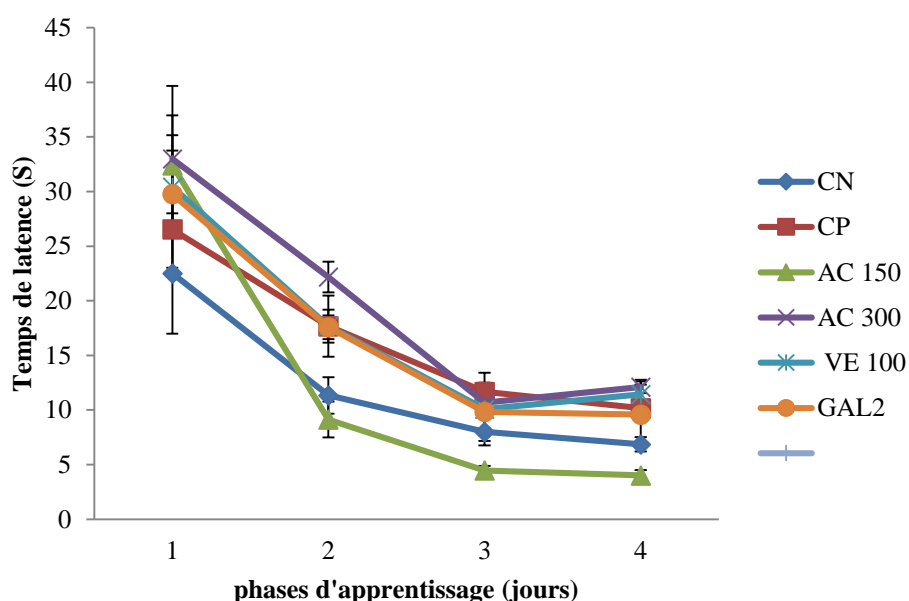


Figure 78: Préservation de l'apprentissage par l'EHEAC (semaine 5)

CN : rates témoins; CP : AlCl₃; AC 150 : AlCl₃ + EHEAC (150 mg/kg); AC 300 : AlCl₃ + EHEAC (300 mg/kg); VE 100 : AlCl₃ + vitamine E (100 mg/kg); GAL 2 : AlCl₃ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur standard.

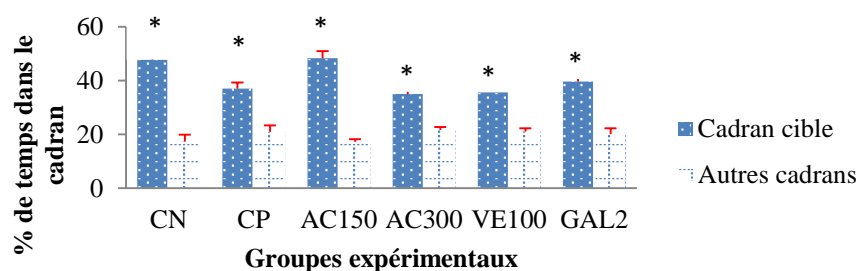


Figure 79: Préservation de la mémoire spatiale par l'EHEAC (Semaine 5)

*CN : rates témoins; CP : AlCl₃; AC 150 : AlCl₃ + EHEAC (150 mg/kg); AC 300 : AlCl₃ + EHEAC (300 mg/kg); VE 100 : AlCl₃ + vitamine E (100 mg/kg); GAL 2 : AlCl₃ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur standard; probe Test : * $p < 0,05$: significativité entre cadran cible et autre cadran du groupe respectif*

➤ Après 8 semaines d'intoxication au chlorure d'aluminium

Après huit semaines, le groupe de rates témoin positif présentait des altérations d'apprentissage mis en évidence par une augmentation significative du temps de latence pour atteindre la plateforme comparée au groupe de rates normales (Figure 80). Un effet significatif ($p < 0,05$) de l'administration concomitante de l'EHEAC (150 mg/kg) était observé sur l'efficacité d'apprentissage. Ce qui n'était pas le cas de l'administration de galantamine ou de la vitamine E (Figure 80). Le jour du test de mémorisation, seules les groupes de rates normales et essai (150 mg/kg) ont parcouru une distance significativement plus importante dans le quadrant cible ($p < 0,05$, premier histogramme) que dans les autres quadrans (moyenne du temps passé dans les autres quadrans, deuxième histogramme) (Figure 81). Ceci indique que ces groupes ont pu se souvenir de la localisation passée de la plateforme donc une bonne capacité de mémorisation des rates. Cependant, les groupes de rates témoins positif et de références passaient autant de temps dans le cadran cible que les autres quadrans. Celles-ci se rapprochaient d'une valeur théorique d'une localisation de la plateforme due au hasard ou à des stratégies résultant d'une mauvaise utilisation des indices distaux ou d'une stratégie nonspatiale.

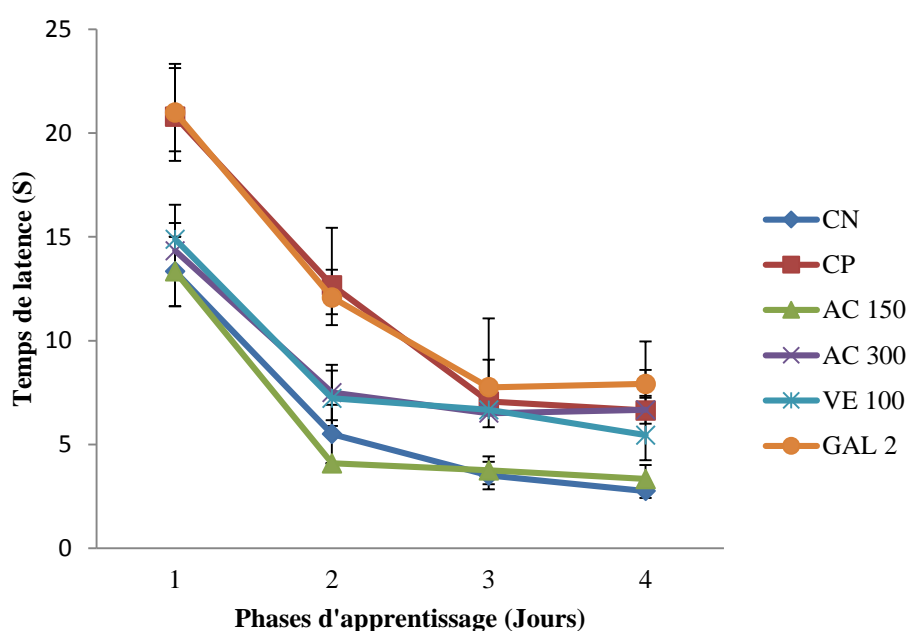


Figure 80: Préservation de l'apprentissage par l'EHEAC (semaine 8)

CN : rates témoins ; CP : $AlCl_3$; AC 150 : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard.

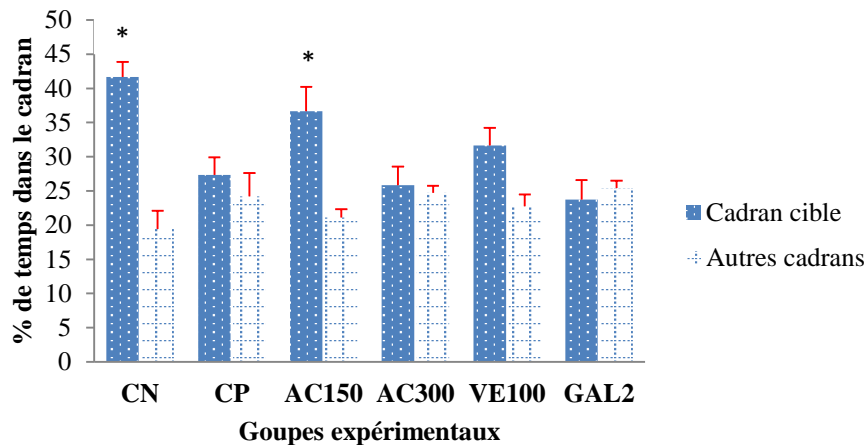


Figure 81: Préservation de la mémoire spatiale par l'EHEAC (semaine 8)

*CN : rates témoins ; CP : AlCl₃ ; AC 150 : AlCl₃ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : AlCl₃ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : AlCl₃ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : AlCl₃ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur standard ; probe Test : * $p < 0,05$: significativité entre cadran cible et autre cadran du groupe respectif.*

III.1.4.2.3. Effet sur la motricité des rates

A la semaine 4 (Figure 82), l'analyse des temps de latence avant la chute ne montrait aucune atteinte de la fonction motrice chez le groupe de rates témoin positif comparée au groupe de rates normales. Mais à la semaine 7 (Figure 83), on observait un trouble de la fonction motrice chez le groupe de rates témoin positif. Ceci se manifestait par une diminution significative ($p < 0,05$) du temps de latence avant la chute comparée au groupe de rates normales. L'administration concomitante de l'EHEAC (150 mg/kg) améliorait significativement ($p < 0,05$) la fonction motrice (Figure 83). Cet effet de l'EHEAC (150 mg/kg) sur la fonction motrice était statistiquement ($p < 0,05$) similaire à celui de la galantamine (2 mg/kg). L'effet de l'EHEAC sur la fonction motrice augmentait de manière non significative avec le temps. Par contre, l'effet de la galantamine (2 mg/kg) diminuait de manière non significative avec le temps (Figure 84).

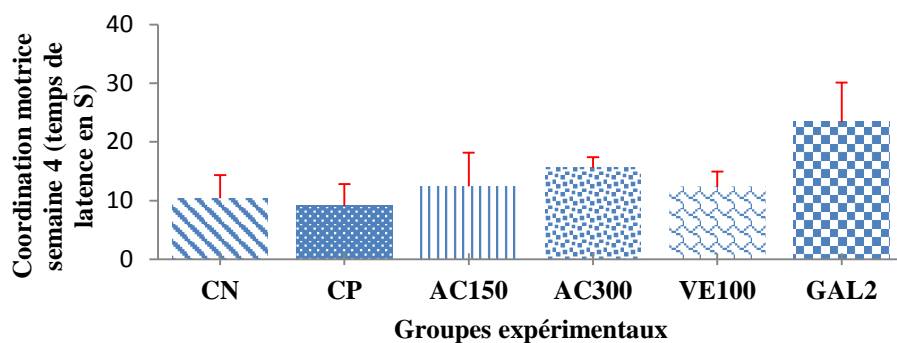


Figure 82: Préservation de la coordination motrice par l'EHEAC (semaine 4)

CN : rates témoins ; CP : $AlCl_3$; AC 150 : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ;* ($p < 0,05$): significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$;[#] ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ;[£] ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par l' $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

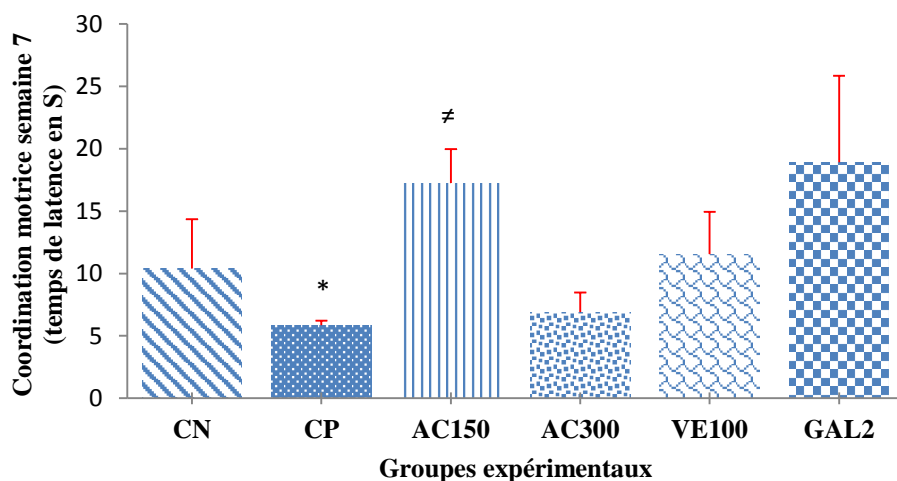


Figure 83: Effet de l'EHEAC sur la coordination motrice des rates (semaine 7)

CN : rates témoins ; CP : $AlCl_3$; AC 150 : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ;* ($p < 0,05$): significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$;[#] ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ;[£] ($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par l' $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

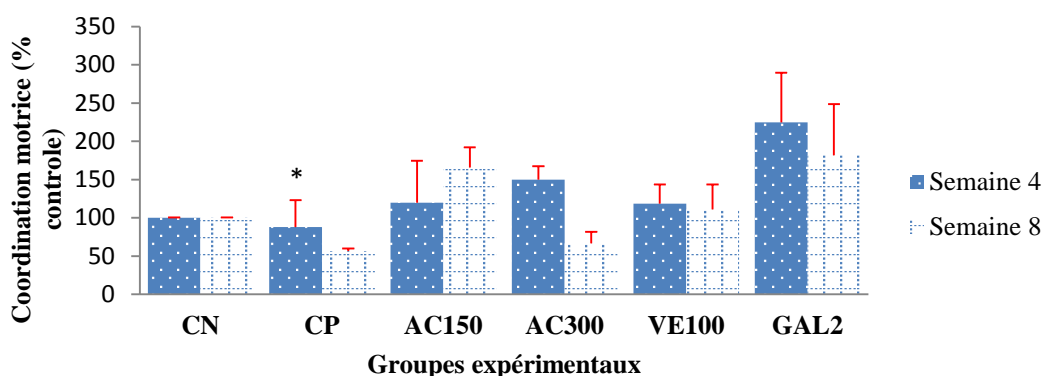


Figure 84: Comparaison des temps de latence en % contrôle des semaines 4 et 7 dans chaque groupe (coordination motrice)

CN : rates témoins ; CP : $AlCl_3$; AC 150 : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : $AlCl_3$ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : $AlCl_3$ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard ;*($p < 0,05$): significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$;[#]($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées uniquement par l' $AlCl_3$ et celles traitées par l' $AlCl_3$ + EHEAC ;[£]($p < 0,05$) : significativité entre les rates traitées par l' $AlCl_3$ + vitamine E ou galantamine et celles traitées par l' $AlCl_3$ + l'EHEAC.

III.1.5. Effet de l'EHEAC sur les paramètres plasmatiques de toxicité et sur la variation de poids corporel et la masse relative des organes

III.1.5.1. Effet de l'EHEAC sur les paramètres plasmatiques de toxicité

Le tableau XIII présente les taux de protéines totales, d'ALAT, d'ASAT et de créatinine plasmatiques.

Tableau XIII: Taux de protéines totales, d'ALAT, ASAT et créatinine plasmatiques

Groupes	Protéines totales (mg/dL)	ALAT (UI)	ASAT (UI)	Créatinine (μ M)
CN	84,2 \pm 4,9	64,4 \pm 2,0	37,7 \pm 4,0	0,18 \pm 0,03
CP	91,4 \pm 4,0	60,0 \pm 2,7	58,97 \pm 6,6 ^{#£}	0,16 \pm 0,02
AC ₁₅₀	77,2 \pm 7,8 ^{#£}	57,5 \pm 1,4	45 \pm 6,5	0,12 \pm 0,03
AC ₃₀₀	91,5 \pm 2,7	59,4 \pm 0,7	58,8 \pm 3,9	0,182 \pm 0,03
VE ₁₀₀	109,0 \pm 3,3	61,3 \pm 1,9	63,1 \pm 9,7	0,18 \pm 0,01
GAL ₂	82,8 \pm 2,4	60,0 \pm 2,3	76,3 \pm 6,7	0,14 \pm 0,03

CN : rates témoins ; CP : $AlCl_3$; AC 150 : $AlCl_3$ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : $AlCl_3$ + EHEAC (300 mg/kg) ;

VE 100 : AlCl₃ + vitamine E (100 mg/kg) ; **GAL 2** : AlCl₃ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur standard ;*(p < 0,05): significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ ;[‡](p < 0,05) : significativité entre les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ et celles traitées par l'AlCl₃ + EHEAC ;[£](p < 0,05) : significativité entre les rates traitées par l'AlCl₃ + vitamine E ou galanthamine et celles traitées par l'AlCl₃ + l'EHEAC.

L'administration de l'AlCl₃ (50 mg/kg) ne provoquait aucune variation significative (p < 0,05) des concentrations en protéines totales, de l'activité de l'ALAT ou de la créatinine mais une augmentation significative (p < 0,05) de l'activité de l'ASAT dans le plasma. La co-administration de l'EHEAC (150 mg/kg) baissait significativement (p < 0,05) la teneur en protéines totales ainsi que l'activité de l'ASAT. L'administration de la vitamine E ou de la galantamine augmentait l'activité de l'ASAT dans le plasma.

III.1.5.2. Effet de l'EHEAC sur la variation de poids corporel et les masses relatives des organes

Le tableau XIV ci-dessous présente la variation du poids corporel des rates, ainsi que les masses relatives de cerveau, cœur et foie

Tableau XIV : Effet de l'EHEAC sur la variation de poids corporel et sur les masses relatives de cerveau, foie et cœur

Groupes	Poids initial (g)	Poids final (g)	Cerveau (g×10 ⁻³)	Foie (g×10 ⁻³)	Cœur (g×10 ⁻³)
CN	274,4 ±19,3	281,6±13,1 (+2,3%)	7,6±0,4	31,5±2,5	3,2±0,2
CP	279,4±13,1	264,4±11,4 (-7,5%)*	6,6 ±0,2*	28,1±1,0	2,9±0,19
AC ₁₅₀	274,7±15,5	274,2±11,8 (-0,0%) [‡]	7,5±0,33 ^{‡£}	26,7±1,7	3,1±0,11
AC ₃₀₀	276,0±15,5	266,5±10,8 (-4,1%)	6,7±0,3	25,0±1,8	3,3±0,12
VE ₁₀₀	270,0±19,5	269,25±9,2 (-0,6%)	7,4±0,0	39,0±1,5	3,4±0,10
GAL ₂	279,0±15,3	278,0±13,0 (-0,3%)	6,7±0,2	30,0±0,6	3,1±0,16

CN : rates témoins ; CP : AlCl₃ ; AC 150 : AlCl₃ + EHEAC (150 mg/kg) ; AC 300 : AlCl₃ + EHEAC (300 mg/kg) ; VE 100 : AlCl₃ + vitamine E (100 mg/kg) ; GAL 2 : AlCl₃ + galantamine (2 mg/kg). Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur standard ;*(p < 0,05): significativité entre les rates contrôles et les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ ;[‡](p < 0,05) : significativité entre les rates traitées uniquement par l'AlCl₃ et celles traitées par l'AlCl₃ + EHEAC ;[£](p < 0,05) : significativité entre les rates traitées par l'AlCl₃ + vitamine E ou galanthamine et celles traitées par l'AlCl₃ + l'EHEAC.

Après 8 semaines d'intoxication à l' AlCl_3 (50 mg/kg), on observait une perte significative ($p < 0,05$) de la masse corporelle des rates. L'administration concomitante de l'EHEAC (150 mg/kg) empêchait significativement ($p < 0,05$) la perte de la masse corporelle des rates. Les résultats montrent également que l'administration de l' AlCl_3 (50 mg/kg) aux rates induit une diminution significative ($p < 0,05$) de la masse relative du cerveau. Dans les mêmes conditions aucune variation significative ($p < 0,05$) des masses relatives du foie, cœur et reins n'est constatée. L'administration concomitante de l'EHEAC (150 mg/kg) réduisait significativement ($p < 0,05$) la perte de la masse cérébrale.

III.2. Discussion

Dans la première partie de cette étude, nous avons procédé à une extraction des composés bioactifs d'intérêts des écorces d'*A. congolensis*. A cet effet deux solvants de polarité croissante ont été utilisés, à savoir l'éthanol (polarité de 5,2) et l'eau (polarité de 9,0). Un mélange équivolume (v:v) de ces deux solvants (pouvant être considéré de polarité intermédiaire) a été également utilisé pour l'extraction des composés bioactifs des écorces. Ce mélange eau-éthanol (v/v) s'est montré particulièrement efficace dans l'extraction de ces composés. En effet, l'extrait hydroéthanolique des écorces d'*A. congolensis* (EHEAC) présentait les meilleures teneurs en polyphénols et flavonoïdes ainsi qu'en proanthocyanes. Plusieurs études antérieures ont montré que le rendement d'extraction augmentait de manière significative avec l'utilisation d'éthanol aqueux ou de méthanol aqueux par rapport aux extractions par les solvants organiques purs (Michel, 2011). La capacité antioxydante *in vitro* des extraits a été évaluée en utilisant plusieurs tests. Les résultats ont montré que tous les 3 extraits (aqueux, hydroéthanolique et éthanolique) présentent une bonne capacité antioxydante totale, piègent le radical synthétique 1,1-diphényl-2-picryl hydrazyle (DPPH) ainsi que le radical biologique oxyde nitrique (NO). Cependant, l'EHEAC s'est montré plus efficace. En effet, les activités d'élimination des radicaux libres peuvent être expliquées par deux mécanismes: l'un est le transfert d'atome d'hydrogène (HAT) et l'autre est le transfert d'un unique électron (SET). L'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS), un radical stable, est principalement réduit par le mécanisme SET (Miller *et al.*, 1993), tandis que le DPPH est principalement réduit par le mécanisme HAT (Brand-Williams *et al.*, 1995). De plus, il existe une relation entre le nombre de groupes hydroxyle, la présence de doubles liaisons sur le cycle C des flavonoïdes, l'énergie de dissociation des liaisons de l'hydrogène et les activités de piégeage radicalaire basées sur SET et HAT (Rice-Evans *et al.*, 1996). Ainsi, la forte activité antiradicalaire de l'EHEAC serait due à la présence dans cet extrait de flavonoïdes

possédant de nombreux groupes hydroxyles pouvant être déprotonés. La capacité des extraits à chélater les ions ferreux a été également évaluée. L'EHEAC s'est montré encore plus efficace à chélater ces ions. La forte capacité chélatrice de l'EHEAC serait également due à sa forte teneur en flavonoïdes. Par ailleurs, d'un point de vue structural, les flavonoïdes ont plusieurs sites potentiels de complexation métallique. Les 5-hydroxyflavones peuvent chélater les ions métalliques grâce au groupement 5-hydroxy-4-carbonyl pour donner un chélate à six centres. Les 3-hydroxyflavones forment avec les ions métalliques un complexe à cinq centres grâce au groupement 3-hydroxy-4-carbonyl. Les 3',4'-dihydroxyflavones (catéchine) chélatent les ions métalliques par l'intermédiaire de leur groupement ortho-dihydroxybenzène (catéchol) présent sur le cycle B (Symonowicz et Kolanek, 2012). Il est à noter également que la stœchiométrie de la complexation varie avec le type de flavonoïde (Symonowicz et Kolanek, 2012). L'EHEAC ayant montré la meilleure activité antioxydante *in vitro* a donc été utilisé pour la suite de notre étude. L'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPLC /SM) de l'EHEAC a révélé la présence de 5 composés majeurs dont seuls 3 ont pu être identifiés sur la base de la littérature. Il s'agissait de la catéchine, de l'acide férulique et du taraxérol. Ces composés ont été précédemment isolés d'*A. congolensis* confirmant sur le plan chimotaxonomique son appartenance à la famille des sapotacées (Fokou *et al.*, 2006). De plus, le taraxérol présente une affinité de liaison élevée pour les monomères et les fibrilles matures de peptides amyloïdes et serait un candidat prometteur mieux que la curcumine pour faire face à la MA (Ngo et Li, 2012). Ce composé est capable de traverser la BHE et aussi être bien absorbé (Ngo et Li, 2012). La catéchine et l'acide férulique sont connus pour leurs fortes activités antioxydantes. De plus, les catéchines sont des activateurs des α -sécrétases et l'acide férulique un modulateur des β -sécrétases (Mori *et al.*, 2019).

La maladie d'Alzheimer (MA) est un trouble neurodégénératif dans lequel le stress oxydatif joue un rôle majeur. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), peut survenir très tôt et peut aggraver sa progression entraînant des lésions tissulaires via plusieurs voies moléculaires. Les ROS peuvent endommager les composants cellulaires essentiels tels que les lipides, les protéines et l'ADN. En effet, Les lipides membranaires, principalement leurs acides gras polyinsaturés (AGPI), sont les cibles privilégiées du radical hydroxyle (OH^\bullet). Ce dernier est capable d'arracher un hydrogène appelé *bis*-allylique attaché sur les carbones intermédiaires, situés entre deux doubles liaisons ($-\text{C}=\text{C}-$), pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. L'hydrogène *bis*-allylique est susceptible de subir cette attaque car il a l'énergie la plus basse de l'acide gras (AG), et plus le nombre d'hydrogènes *bis*-

allyliques augmente, plus cet acide est susceptible à l'attaque oxydante (Hulbert, 2010). Cette réaction, appelée peroxydation lipidique, implique une réaction en chaîne, le radical peroxyde ainsi formé se transformant en peroxyde au contact d'un autre AG qui forme un nouveau radical diène conjugué. Les aldéhydes générés en conséquence (malonaldéhyde) sont très réactifs vis-à-vis des autres molécules biologiques. De plus, plusieurs auteurs ont suggéré que l'aluminium exerce une activité pro-oxydante malgré son statut non-rédox. Cet effet impliquerait plusieurs mécanismes potentiels, avec notamment l'effet de l'aluminium sur l'homéostasie du fer (Wu *et al.*, 2012). L'interaction de ces deux agents génère du fer labile provenant des enzymes et protéines contenant du fer, ce qui augmente le pool intracellulaire de fer libre et favorise ainsi la formation de ROS. Tout ceci pourrait expliquer l'augmentation significative de la formation de diènes conjugués et la génération de malondialdéhyde observée chez les rates témoin positif. Les concentrations de diènes conjugués et de MDA étaient significativement augmentées chez le groupe de rates témoin positif comparé au groupe de rates normales. De plus on notait chez ces rates une accumulation significative des protéines oxydées. En effet, les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases, en particulier du protéasome. Si elles ne sont pas éliminées, ces protéines deviennent dangereuses pour la cellule dont elles menacent l'homéostasie métabolique (Sultana *et al.*, 2012). L'oxydation des enzymes menant à des perturbations métaboliques, l'inactivation des protéases peut altérer l'élimination des protéines oxydées qui peuvent alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules (Sultana *et al.*, 2012). Cette accumulation des protéines oxydées peut s'expliquer par l'augmentation des taux d'oxydation des protéines et/ou par la diminution des capacités d'élimination des protéines oxydées. Ce qui pourrait se justifier par la réduction significative des activités des enzymes antioxydantes la catalase et la GPx en l'occurrence observée chez les rates du groupe témoin positif. Ces résultats sont concordant avec les données de la littérature montrant d'une part que la toxicité oxydative de l'aluminium est reliée à une augmentation chez le rat de la peroxydation lipidique, à une fluidité membranaire diminuée et à l'oxydation des protéines. D'autre part, l' Al^{3+} réduit l'activité chez le rat de certaines enzymes antioxydantes comme la catalase, la SOD et la GPx, ce qui aggrave les dommages neuronaux induits par le stress oxydatif (Naidu *et al.*, 2013). L'administration concomitante de l'EHEAC à faible dose (150 mg/kg) empêchait le processus de lipoperoxydation et l'accumulation des protéines oxydées et favorisait la régénération d'antioxydants au niveau cérébral. L'effet protecteur de l'EHEAC peut impliquer son activité de piègeur de radicaux libres et/ou la régulation d'enzymes antioxydantes. En effet, Cassidy *et al.*, (2020), montraient que l'huile d'arganier (*A. spinosa*) contenant de fortes teneurs

en molécules antioxydantes était capable d'empêcher la surproduction des radicaux peroxy et alkoxy (ROO^\bullet , RO^\bullet) qui pourraient induire la peroxydation lipidique. L'EHEAC pourrait induire également une neuroprotection par chélation des métaux de transition via le fragment ortho-3,4-dihydroxy et le fragment 4-céto, 3-hydroxyle ou 4-céto et 5hydroxyle des catéchines. Ces structures agissent en tant que points de fixation des métaux de transition et neutralisent leur activité en convertissant leur forme active en un complexe inactif d'oxydo-réduction qui va prévenir les dommages oxydatifs des cellules. Enfin, les polyphénols peuvent activer le facteur de transcription Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) qui, en se liant aux sites ARE (*Antioxidant Responsive Element*) et EpRE (*Electrophile Response Element*) des régions régulatrices, peut alors activer l'expression de gènes cibles comme la catalase ou de la GPx. Contrairement à l'EHEAC, la vitamine E (100 mg/kg) n'améliorait pas significativement les marqueurs de stress oxydant au niveau du cerveau. En effet, il a été suggéré que la vitamine E a un effet biphasique, qui peut être à la fois anti et pro-oxydant. Cela dépend de la durée et la dose de traitement (Abubakar et al., 2004 ; Stocker, 1999). A l'instar des résultats obtenus les effets potentiels pro-oxydants de la vitamine E pourraient être expliqués par la dose ou la durée de traitement. La peroxydation lipidique en chaîne altère les propriétés physicochimiques et fonctionnelles des membranes, portant préjudice à la fonction de nombreux récepteurs et transporteurs membranaires, ainsi qu'à la transduction des signaux. (Tamagano et al., 2003).

La transmission cholinergique est l'une des principales fonctions altérées au cours de la MA. L'acétylcholinestérase (AChE) est un marqueur non spécifique mais très sensible de l'innervation cholinergique du cerveau (Jazi et al., 2009). En effet, la mesure de l'activité de cette enzyme réalisée dans le cerveau de rates, n'a révélé aucune différence significative entre les groupes de rates normales et témoin positif. Néanmoins, une hyperactivité enzymatique de la butyrylcholinestérase (BuChE) était observée chez le groupe de rates témoin positif. De plus, le rapport BuChE / AChE était significativement augmenté chez ce dernier. En effet, lors de la progression de la MA, les niveaux corticaux de BuChE sont augmentés et ses propriétés enzymatiques et ses formes moléculaires sont modifiées (Darvesh et al., 2003). Par conséquent, le rapport BuChE / AChE passe de 0,2 à 11 dans les zones corticales du cerveau souffrant de la MA. En conséquence, cette hyperactivité enzymatique de la BuChE ou cette augmentation du rapport BuChE / AChE pourrait résulter d'un dysfonctionnement de la transmission cholinergique ou d'une perte de l'innervation cholinergique. D'un autre côté, l'administration concomitante de l'EHEAC (150 mg/kg) aux rates a conduit à une diminution significative des activités enzymatiques de l'AChE et de la BuChE et par conséquent le rapport BuChE/AChE (figure). Ceci traduirait donc un effet modulateur de l'extrait sur la transmission ou

l'innervation cholinergique. Un tel effet pourrait être dû à une action inhibitrice directe de l'EHEAC sur l'activité des cholinestérases. Il existe également la possibilité qu'elle soit liée à l'un ou plusieurs composés bioactifs en l'occurrence la catéchine ou d'autres flavonoïdes ou du taraxérol identifiés dans cet extrait. En effet, Kim et *al.* (2004) ont reporté que l'activité de l'AChE était remarquablement inhibée par les catéchines du thé chez des rats amnésiques. De même, dans une étude *in vitro*, Wang et *al.* (2017) ont montré le potentiel inhibiteur de l'AChE des différentes catéchines isolées du thé (*Camellia sinensis var assamica*). Il s'agissait de l'épigallocatechine-3-O-cafféate ($CI_{50} = 2,49 \mu\text{mol/L}$), épigallocatechine-3-O-p-coumarate ($CI_{50} = 11,41 \mu\text{mol/L}$) et épigallocatechine-3-O-féruleate ($CI_{50} = 62,26 \mu\text{mol/L}$). La simulation par modélisation moléculaire a confirmé la liaison étroite des 3 catéchines avec l'AChE pour générer une forte activité inhibitrice de l'enzyme. Par ailleurs, une autre étude *in vivo* a rapporté qu'un extrait de feuille de thé vert contenant de l'épigallocatechine-3-gallate et de l'épicatéchine améliorait les niveaux d'AChE chez des rats intoxiqués à l' AlCl_3 (Jelenković et *al.*, 2013). Des études ont également rapporté des activités inhibitrices potentielles des aglycones—quercétine contre l'AChE ($CI_{50} = 353,86 \mu\text{mol/L}$) et la butyrylcholinestérase (BuChE) ($CI_{50} = 420,76 \mu\text{mol/L}$). Celles-ci seraient dues à la capacité de la quercétine à se lier étroitement avec ces enzymes et à présenter un certain nombre de liaisons hydrogènes fortes avec plusieurs résidus d'acides aminés importants des deux enzymes (Khan et *al.*, 2009). Des effets inhibiteurs de l'activité de l'AChE par le taraxérol ont été également observés. En effet, Jamila et *al.* (2015) dans une étude *in vitro* ont montré que le taraxérol isolé des écorces de *Garcinia hombroniana* inhibait l'activité de la BuChE ($CI_{50} = 17,8 \pm 1,73 \mu\text{mol/L}$). De plus, Talita et *al.* (2018) ont constaté que le taraxérol isolé à partir des feuilles d'*Eugenia umbelliflora* Berg inhibait significativement l'activité de l'AChE hippocampique des rats sur lesquels des troubles de mémoire aversifs avaient été induits par la scopolamine et la streptozotocine. Il est intéressant de noter que l'EHEAC (150 mg/kg) présentait un taux d'inhibition de l'AChE similaire à celui de la galantamine qui n'a pas inhibé l'activité de la BuChE. La BuChE ou l'AChE dégradent donc l'acétylcholine qui est utilisé comme neurotransmetteur dans l'innervation cholinergique. Pour que ce neurotransmetteur vienne se fixer sur ses récepteurs spécifiques présents sur la membrane post-synaptique, il faudrait qu'il soit libéré des vésicules. C'est en effet l'intrusion des ions Ca^{2+} qui va permettre la fusion des vésicules de transport contenant le neurotransmetteur avec la membrane présynaptique. Une dérégulation de l'homéostasie du calcium a donc un impact sur les fonctions neuronales dépendant du calcium telles que la libération de neurotransmetteurs.

L'ion calcium est le messenger intracellulaire le plus important très impliqué dans la survie et la mort neuronale. L'incapacité des neurones à réguler l'homéostasie du Ca^{2+} est un aspect de la MA intimement responsable de la mort des neurones (Magi *et al.*, 2016). Cet ion est impliqué dans les processus d'excitotoxicité, de production de radicaux libres et d'apoptose (Starkov, 2010). Dans cette étude, une accumulation non significative de calcium cérébral était observé chez le groupe de rates témoin positif comparé au groupe de rates normales. Cette augmentation pourrait être due au système de maintien de l'homéostasie grâce aux détecteurs de calcium neuronal (Yarlagadda *et al.*, 2007). En effet, suite à la dépolarisation de la membrane due à la rupture du stock énergétique cellulaire par exemple, les canaux calciques voltage-dépendants tels les récepteurs NMDA s'ouvrent et permettent l'entrée du calcium à l'intérieur de la cellule. L'ouverture du pore de ces récepteurs canaux dépend à la fois de la fixation du glutamate et d'une forte dépolarisation de la membrane post-synaptique. Cette dépolarisation est nécessaire pour induire la libération d'un ion magnésium qui obstrue le pore du canal à l'état basal (Basheer *et al.*, 2016). Le taux de Mg^{2+} dans les cerveaux des rates du groupe témoin positif était significativement diminué comparé aux rates contrôles. En effet, des études ont montré qu'un faible taux de Mg^{2+} conduit à une surexcitation des neurones et se traduit par une augmentation du rapport $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ dans les tissus du système nerveux central promettant ainsi les processus de neurodégénération (Basheer *et al.*, 2016). Ainsi, une diminution des concentrations Mg^{2+} ou une augmentation du rapport $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ favoriseraient l'ouverture du canal ionique couplé au récepteur NMDA, permettant un influx de Ca^{2+} dans la cellule. Ce qui pourrait expliquer l'accumulation du calcium au niveau cérébral. L'homéostasie ionique étant également maintenu par l'activité enzymatique des pompes ioniques (ATPases), nous avons au cours de cette étude évalué les activités enzymatiques de la Na^+ , K^+ -ATPase, la Mg^{2+} -ATPase et la Ca^{2+} -ATPase. Les résultats ont montré une diminution significative de leurs activités chez le groupe de rates témoin positif comparée aux rates contrôles. Par ailleurs, la Na^+ , K^+ -ATPase, la Mg^{2+} -ATPase et Ca^{2+} -ATPase sont des enzymes membranaires responsables du transport des ions à travers la membrane, leur permettant ainsi de réguler le volume cellulaire, la pression osmotique et la perméabilité membranaire (Reddy et Philip, 1992). En fait, il a été montré que l'activité de la PMCA (ATPase- Ca^{2+} de la membrane plasmique) est assez sensible aux propriétés biophysiques des lipides environnants. L'enzyme présente une activité beaucoup plus élevée lorsqu'elle est localisée dans des régions de lipides ordonnés. Des auteurs ont suggéré que l'augmentation de l'activité de l'enzyme dans ces régions serait due à la stabilisation lipidique de la conformation active de l'enzyme formée au cours du cycle catalytique (Duan *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2006). La PMCA peut également être inactivée de

manière réversible par les ROS par un mécanisme qui semble être une modification réversible de la cystéine. Les ROS peuvent également modifier les résidus tyrosine 589, méthionine 622 et 831 (Galan *et al.*, 2010). De plus, des preuves indiquent que l'inactivation de cette pompe par les ROS pourrait être un système de protection pour éviter la consommation d'ATP dans les conditions de stress oxydatif (Galan *et al.*, 2010). Il semble donc probable que la faible activité de la Ca²⁺-ATPase chez le groupe de rates témoin positif soit due à une modification de l'environnement oxydatif et /ou lipidique et par conséquent une diminution de l'efflux du calcium. Quant à la Na⁺, K⁺-ATPase, il a été montré que son activité hydrolytique complète dépend de l'association entre les phospholipides et le cholestérol de la membrane plasmique. En effet l'enzyme est stabilisée par le ratio phosphatidylsérine/cholestérol et est stimulée par les phospholipides neutres (Habeck *et al.*, 2015). Elle est également particulièrement sensible à l'inactivation dans des conditions de stress oxydatif. En effet, il a été observé que l'activité de l'enzyme diminue avec la peroxydation lipidique et que les groupements thiol (-SH) de cette protéine sont très sensibles au stress oxydant (Mishra *et al.*, 1989). Ainsi, sa faible activité pourrait être également liée à la modification de l'environnement oxydatif. Par ailleurs, la fonction cationique de la Na⁺, K⁺-ATPase est le maintien des gradients sodique et potassique. En effet, elle échange 3 ions sodium (Na⁺) du cytoplasme vers l'espace extracellulaire et de 2 ions potassium (K⁺) dans la direction opposée de leurs gradients respectifs naturels, en dépensant une molécule d'ATP (Sweadner, 1991). Cette fonction de la Na⁺, K⁺-ATPase permet le maintien du potentiel membranaire au repos et la restauration du potentiel membranaire suite à une dépolarisation (Sweadner, 1991). De même, le fonctionnement de la synapse glutamatergique ainsi que la capture du glutamate par les astrocytes nécessitent l'activation de cette pompe (Harbeby *et al.*, 2012). Aussi, les NCX sont impliqués à la fois dans l'extrusion et l'entrée des ions Ca²⁺ et Na⁺ (3 Na⁺ pour 1 Ca²⁺) car ces échangeurs possèdent deux modes de fonctionnement dits « normal » et « inverse ». Le choix du mode de fonctionnement est déterminé par le gradient transmembranaire de Na⁺ et le potentiel membranaire (l'augmentation du Na⁺ et la dépolarisation favorisent le mode inverse et vice versa). Ainsi, une diminution de l'activité enzymatique de la pompe Na⁺, K⁺-ATPase conduirait à une augmentation du Na⁺ et une dépolarisation de la membrane, un mode inverse de la NCX, une sur-activation des neurones par le glutamate et ainsi une entrée massive du calcium dans la cellule (Mayer et Westbrook, 1987). De cette façon, l'augmentation du Ca²⁺ cérébral ou du rapport Ca²⁺/ Mg²⁺ observé pourrait être la conséquence d'une augmentation de l'influx du calcium via les récepteurs NMDA ou via la NCX (suite à la diminution de l'activité de la Na⁺, K⁺-ATPase) et une diminution de son efflux via la PMCA. Des études antérieures ont également montré que

l'Al altère l'homéostasie du calcium intracellulaire via son action sur les canaux voltage sensibles ou en inhibant les activités de la Ca^{2+} -ATPase et de la Mg^{2+} -ATPase (Walton, 2012). L'administration concomitante de l'EHEAC (150 et 300 mg/kg) aux rates a permis de maintenir les concentrations cérébrales de calcium et de magnésium. L'EHEAC pourrait ainsi avoir un effet modulateur de l'homéostasie du calcium. Ceci en agissant soit sur les pompes Ca^{2+} -ATPase dont l'activité enzymatique était augmentée par l'EHEAC. En effet, certains flavonoïdes agissent non seulement comme antioxydants, mais sont également capables de se lier directement aux Ca^{2+} -ATPases, modifiant ainsi leur conformation, ce qui entraîne une modulation de leur activité (Oluseye *et al.*, 2008 ; Blaškovič *et al.*, 2013). Ils sont capables soit de stimuler ou d'inhiber l'activité de ces enzymes dépendant de leur potentiel anti-radicalaire et de leur lipophilie. Les flavonoïdes ayant un fort potentiel antiradicalaire et une bonne lipophilie pour pénétrer la bicouche lipidique membranaire stimulent l'activité de l'enzyme (Blaškovič *et al.*, 2013). Ce qui suggère la présence de ce type de flavonoïdes dans l'EHEAC. L'EHEAC pourrait également agir sur la dépolarisation des neurones à travers son effet sur l'activité enzymatique de la Na^+ , K^+ -ATPase qui aussi était augmentée. En effet, des études ont montré que les composés phénoliques sont capables de moduler l'activité enzymatique de cette pompe ionique (Khalid *et al.*, 2015, Komolafe *et al.*, 2018). Enfin, l'EHEAC pourrait agir sur les courants de calcium dépendant du voltage et des courants induits par les récepteurs NMDA. Des études ont montré que l'acide férulique était capable d'inhiber ces courants et pourrait agir comme un antagoniste compétitif des récepteurs NMDA (Yu *et al.*, 2006 ; Lin *et al.*, 2013). Les récepteurs NMDA du glutamate, les récepteurs nicotiniques (ionotropiques) et muscariniques (métabotropiques) de l'acétylcholine sont associées aux radeaux lipidiques (Sebastiao *et al.*, 2013). Ainsi, le taux de cholestérol présent dans les radeaux lipidiques synaptiques a une forte influence sur la signalisation neuronale et la plasticité synaptique (Sebastiao *et al.*, 2013). Les changements dans la fluidité membranaire peuvent également influencer sur les propriétés de signalisation. De plus, de nombreuses études mettent en évidence un lien entre l'accumulation de cholestérol au niveau de la membrane et l'augmentation du calcium intracellulaire (Allen, *et al.*, 2007). Dans ces travaux, les dosages des lipides cérébraux ainsi que plasmatique ont révélé des changements significatifs dans leurs compositions chez les rates intoxiquées à l' AlCl_3 comparés aux rates normales. En effet, l'administration du AlCl_3 induisait une augmentation significative du contenu en cholestérol cérébral et une diminution significative du niveau de plasmalogènes cérébraux. Ces derniers sont des étherlipides constitués d'une base glycérol, à laquelle sur le premier carbone se lie un alcool gras par une liaison vinyle-éther. Environ 15 à 20% des phospholipides totaux composant les membranes cellulaires sont des plasmalogènes.

Ils jouent un rôle dans le transport des vésicules lors de la neurotransmission, dans le stockage d'acides gras polyinsaturés neuroprotecteurs, dans l'élimination des radicaux libres et la stabilité membranaires (Han et al., 2001). Ceux-ci se retrouvent en grande quantité dans le cerveau et le cœur. En effet, le maintien du ratio cholestérol/phospholipides (CH/PL) dans la membrane est crucial pour les fonctions cellulaires. En réponse à un excès de cholestérol intracellulaire, la cellule met en place une réponse adaptative visant à augmenter la synthèse des phospholipides et notamment des phosphatidylcholines permettant de rétablir un ratio CH/PL. Le ratio molaire CHL/PL est donc un indice accepté pour évaluer la fluidité membranaire (Senault et al., 1990). Ce ratio était augmenté chez le groupe de rates témoin positif suggérant une diminution de la fluidité des membranes ou une perte de leur intégrité (Sarin, 1997). De même, l'administration de l' AlCl_3 induisait une élévation de la cholestérolémie et la triglycéridémie indiquant une perturbation du métabolisme périphérique des lipides. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études montrant la capacité de l' AlCl_3 à induire des changements dans la composition lipidique et les propriétés physiques de la membrane plasmique. En effet, Pandya et al. (2004) avaient examiné le profil lipidique de la gaine de myéline des rats après exposition à l' AlCl_3 . Les résultats montraient une diminution de 60% de la teneur en phospholipides totaux, tandis que la teneur en cholestérol augmentait de 55%. Le rapport molaire PL/CHL quant à lui diminuait significativement de 62%. La composition en différents glycérophospholipides de la membrane de myéline était similaire aux profils de glycérophospholipides rapportés dans les cerveaux des patients atteints de la MA. Sarin et al. (1997) dans leur étude sur l'évaluation de la composition lipidique et diverses enzymes liées à la membrane dans différentes régions du cerveau des singes après une exposition chronique à l' AlCl_3 obtenaient des résultats similaires. En outre, dans les cellules humaines neuroblastome, Verstraeten et al. (2002) ont montré que l' AlCl_3 (10 à 100 μM) provoquait une perte significative de la fluidité de la membrane. Ainsi, à travers sa propriété dyslipidémique, l'Al contribuerait à une forte accumulation des lipides dans les radeaux de la membrane neuronale conduisant à la MA. Ainsi, une accumulation du cholestérol cérébral, due à une possible altération dans son transport ou son élimination intervient dans le développement des lésions de la MA (Abulrob et al., 2005). L'administration concomitante de l'EHEAC (150 mg/kg) empêchait l'accumulation du cholestérol dans le cerveau, maintenait le niveau de plasmalogènes et augmentait le niveau de phospholipides cérébraux. Le ratio cholestérol/phospholipides était par conséquent maintenu. L'EHEAC (150 mg/kg) a en plus entraîné une baisse significative de la cholestérolémie et de la triglycéridémie. L'hypercholestérolémie et l'hypertriglycidémie observées dans cette étude pourrait être

attribuée en grande partie à l'accumulation de l'Al dans le foie, provoquant une altération du métabolisme des lipides (Fyiad, 2007 ; Wilhelm *et al.*, 1996). Cela met donc en évidence un effet modulateur de l'EHEAC sur le métabolisme lipidique en particulier du cholestérol aux niveaux cérébral et hépatique. Un tel effet modulateur pourrait être tout au moins ou en partie dû à la présence des composés bioactifs identifiés dans cet extrait (catéchine, acide férulique et taraxérol). En effet, les triterpènes pentacycliques tels le taraxérol sont des analogues structurels du cholestérol. Ainsi, ces composés sont connus comme protecteurs des lipides membranaires, modulateurs des propriétés physiques des membranes lipidiques et du métabolisme lipidique (Abboud *et al.*, 2016; Haralampiev *et al.*, 2017). Trois triterpènes pentacycliques, l' α -amyrine, le lupéol et le taraxérol ont été étudiés par Rodriguez *et al.* (1997) pour leur effet sur la fluidité des bicouches lipidiques formées de Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), en comparaison avec le cholestérol. Les résultats obtenus ont montré que l' α -amyrine était incorporé à des taux aussi élevés que le cholestérol (50 mol%), le taraxérol était également incorporé bien qu'à un taux relativement faible (Rodríguez *et al.*, 1997). Il serait donc possible qu'en s'incorporant dans les membranes lipidiques cérébrales, le taraxérol contenu dans l'EHEAC déplace le cholestérol vers l'extérieur modifiant ainsi son homéostasie ou son métabolisme (Haralampiev *et al.*, 2017). De même, il a été montré que les catéchines du thé vert réduisent le cholestérol plasmatique dans différents modèles animaux et influent favorablement sur le métabolisme du cholestérol dans les cultures cellulaires. Ceci via la régulation des récepteurs LDL se produisant par l'activation du SREBP-2 (Bursill *et al.*, 2001 ; Bursill *et al.*, 2007). De plus, Cheng et Wang (2015) ont montré que l'acide férulique augmentait les expressions des ABCA1 et ABCG1 dans les cellules spumeuses des macrophages et promouvant ainsi l'efflux du cholestérol. En ce qui concerne, l'augmentation des taux de plasmalogènes, elle serait due à la capacité de l'EHEAC à diminuer la peroxydation des lipides, et également empêcher la libération des ions Fe^{2+} qui provoqueraient la fragilité de la membrane et l'épuisement des antioxydants. (Braverman et Moser, 2012). Ces effets bénéfiques de l'EHEAC sur ces glycérophospholipides pourraient être attribués à la présence des antioxydants membranaires. Les cellules nerveuses fonctionnent en aérobie et par conséquent, leur activité est dépendante de la consommation de glucose et du métabolisme oxydatif.

L'activité neuronale, le métabolisme du glucose et le métabolisme énergétique sont intimement liés et concentrés principalement dans le compartiment cellulaire mitochondrial. La cellule nerveuse métabolise le glucose au niveau du cycle de Krebs et utilise la chaîne de la phosphorylation oxydative pour produit l'ATP (34 ATP par molécule de glucose) nécessaire au

fonctionnement cellulaire. L'énergie fournie sous forme d'ATP au sein de la cellule nerveuse sert globalement à alimenter les pompes ioniques, permettre le transport axonal ou encore assurer la synthèse des macromolécules et neuromédiateurs (Castellani et *al.*, 2002). Nous avons observé lors de cette étude, un taux significativement élevé de glucose et une augmentation de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) chez le groupe de rates témoin positifs comparés au groupe de rates contrôles. Cet hypermétabolisme pourrait signaler des phénomènes de compensations fonctionnelles ou de dysconnexions de la part des cellules intactes ou des synapses restantes, celles-ci travaillant plus pour pallier à la dégénérescence (Chételat et *al.*, 2006). Il pourrait également refléter un mécanisme compensatoire suite à un dysfonctionnement cellulaire, notamment des mitochondries (Bigl et *al.*, 1999 ; Newington et *al.*, 2012). En effet, le pyruvate, produit final de la glycolyse, peut être utilisé par la LDH ou par la pyruvate déshydrogénase (PDH) puis par le cycle de Krebs. En fait, l'aconitase catalyse la synthèse d'isocitrate à partir du citrate. L'isocitrate subit ainsi une décarboxylation oxydative par l'isocitrate déshydrogénase (IDH) permettant la formation d' α -cétoglutarate. Du NADH est également synthétisé par réduction du NAD^+ (Stobbe et *al.*, 2012). Ce NADH va ensuite être transféré à la chaîne de transport des électrons faisant ainsi de l'IDH la première enzyme reliant le cycle de Krebs à la chaîne respiratoire. Une inhibition de l'activité de l'aconitase (observée dans cette étude chez les rates traitées uniquement à l' AlCl_3) pourrait donc diminuer la formation d'isocitrate et de NADH affectant ainsi la chaîne de transport des électrons. Ceci aurait pour conséquence une diminution de la production d'ATP. De plus, Dua et *al.* (2010) observaient qu'une exposition aiguë des rats au phosphate d'aluminium induisait une inhibition du cytochrome oxydase enzyme du complexe IV de la chaîne respiratoire. Cette inhibition entraînait une diminution de la capture de l'oxygène et de la synthèse d'ATP et une augmentation concomitante de la dégradation du glycogène et l'activité des enzymes glycolytiques. Ceci afin de faire face à la demande énergétique locale. Une telle réponse a été également observée chez les patients atteints de troubles cognitifs légers (*Mild Cognitive Impairment*, MCI) (Rapoport, 1999). Par ailleurs, la glycolyse permet une production rapide d'ATP mais en quantité limitée puisque celle-ci ne produit que 2 molécules d'ATP par molécule de glucose (Ganapathy-Kanniappan et Geschwind, 2013). Ce qui pourrait justifier l'augmentation de la mobilisation des molécules de glucose pour combler le déficit de production d'ATP. Ainsi, cette augmentation du contenu en glucose et de l'activité de la LDH dans le cerveau pourrait être associée à une diminution de la production d'énergie due à un dysfonctionnement mitochondrial. L'administration concomitante de l'EHEAC diminuait le niveau de glucose dans le cerveau et l'activité de la LDH. Ceci pourrait être dû à une

amélioration de la fonction mitochondriale (augmentation de l'activité de l'aconitase) ou encore à une réduction du processus neurodégénératif au niveau de l'hippocampe.

L'hippocampe apparaît comme une structure majeure de la pathophysiologie de la MA. Au niveau moléculaire, c'est une des premières structures atteintes par les dégénérescences neurofibrillaires (DNF). L'hippocampe présente une autre forme d'implication dans la MA : cette structure est en effet le lieu d'une neurogenèse persistante qui a été montrée comme atteinte dans la pathologie. A l'âge adulte, il subsiste deux zones de production de nouveaux neurones dans le cerveau : la zone sous-ventriculaire et le Gyrus Denté (GD) de l'hippocampe. Il a été montré que l'âge et les processus de neuroinflammation et de neurodégénération avaient un effet néfaste sur cette neurogenèse adulte (Fuster-Matanzo et *al.*, 2013). Les analyses histopathologiques ont montré chez les rates témoin une architecture organisée de l'hippocampe, avec des neurones d'aspect intact dans les différentes couches (GD, CA1, CA2 et CA3). A l'inverse, chez le groupe d'animaux témoin positif, les diverses techniques histologiques utilisées ont mis en évidence plusieurs modifications neuropathologiques (désorganisation cellulaire, cytolysse neuronale, dégénérescence cellulaire et une perte cellulaire importante). Les couches CA1, CA3 (une perte neuronale de près de la totalité de la population) et le GD étaient très affectés. Par ailleurs, des études suggèrent un lien causal *in vivo* entre l'accumulation du cholestérol dans les neurones et les processus neurodégénératifs. Les neurones pyramidaux de la région CA1, CA3 (corps cellulaires et dendrites), ainsi que les interneurons de la couche « stratum radiatum » expriment la cholestérol-24-hydroxylase. Ainsi, il a été montré que l'accumulation de cholestérol induite par l'inhibition de l'expression du gène Cyp46A1 dans les neurones de l'hippocampe entraîne une cascade d'événements caractérisée par la production de peptides A β , la phosphorylation de la protéine tau, une augmentation des céramides à longues chaînes, aboutissant à un processus de perte neuronale associé à des défauts mnésiques et une atrophie hippocampique (Ayciriex et *al.*, 2017). Aussi, il a été montré que les peptides A β en s'accumulant dans les mitochondries induisent une entrée excessive de Ca²⁺ dans les neurones, une libération accrue des radicaux libres, une perturbation du métabolisme énergétique ce qui favorisent les processus métaboliques menant à l'apoptose (Mattson et *al.*, 2008). L'Aluminium est également capable d'induire l'expression des gènes pré-apoptotiques (Natiya et *al.*, 2012). Ainsi, ces modifications neuropathologiques observées à différents niveaux de l'hippocampe pourraient être dues, non seulement à une atteinte de la neurogenèse, mais également à une accumulation du cholestérol et une apoptose cellulaire. L'administration concomitante de l'EHEAC (150 mg/kg) préservait l'architecture des couches

de l'hippocampe. Cette co-administration d'EHEAC a permis de préserver les neurones de la zone CA1 et d'atténuer de manière significative l'atteinte à l'intégrité neuronale de la zone CA3 de l'hippocampe, zone liée à la plasticité neuronale et à la mémoire à long terme (Ramírez-Amaya *et al.*, 2001). En effet, les polyphénols et leurs métabolites pourraient se fixer à différents récepteurs cellulaires comme les récepteurs δ -opioïdes de la nicotine, des estrogènes et de la testostérone. Une fois liés à leurs récepteurs, ces composés modifient l'activation des kinases, qui pourrait moduler la plasticité neuronale et stimuler la synthèse de nouvelles protéines synaptiques (Vauzour, 2012 ; Williams et Spencer, 2012). Ils jouent ainsi un rôle particulièrement important pour préserver la survie neuronale et les fonctionnalités synaptiques du SNC (Vauzour *et al.*, 2008). Les médicaments de référence (notamment la galanthamine) atténuent très peu les modifications neuropathologiques dans les différentes couches de l'hippocampe. Ceci renforce le fait que les médicaments actuels contre la MA ont une efficacité minime et n'empêchent pas la dégénérescence neuronale, ni la mort neuronale. La mémoire de reconnaissance fait référence à la capacité à discriminer, reconnaître une personne ou un objet rencontré au préalable. Elle implique le cortex périrhinal et le cortex entorhinal latéral (LEC) (Brown et Aggleton, 2001). (Knierim, 2015). Dans cette étude, nous avons évalué les mémoires à court et à long terme, lesquelles sont très affectées dans la MA (Dibo-Cohen, 2006). L'administration chronique de l' AlCl_3 (50 mg/kg) aux rates, a donné lieu à une détérioration progressive de la mémoire de reconnaissance telle que déterminée par le test de reconnaissance d'objet. En effet, à la semaine 4 de traitement la mémoire de reconnaissance à court terme était déjà altérée (MRCT) par contre c'est à partir de la semaine 7 que la mémoire de reconnaissance à long terme (MRLT) était altérée. Il serait vraisemblable que la MRLT soit touchée plus tardivement ou soient plus résistantes. Des résultats similaires ont été évoqués dans d'autres études qui ont démontré que des rats exposés à certains pesticides (malathione ou Diméthoate) avaient une MRCT plus altérée comparé à la MRLT. Il a été suggéré que cette différence serait due au fait que le processus de MRLT implique plusieurs composantes (N'Go *et al.*, 2013 ; Samih *et al.*, 2017). En effet, des études antérieures ont montré qu'une exposition à l' AlCl_3 induit des dommages de la mémoire spatiale, en conduisant à des changements neuronaux et synaptiques et par conséquent, à une altération de la potentialisation à long terme (LTP) au niveau de l'hippocampe (Zhang *et al.*, 2013). Après 5 et 8 semaines d'administration de l' AlCl_3 , nous avons exploré les capacités d'apprentissage des rates conditionnées à un test contraignant, impliquant la nage forcée en piscine pour trouver une plateforme permettant de s'échapper du milieu liquide, aversif pour les animaux. La latence, correspondant au temps nécessaire pour que la rate trouve la plateforme immergée à l'aide des seuls repères spatiaux, doit normalement

diminuer chaque jour, témoignant ainsi que l'animal apprend la tâche et mémorise l'emplacement de la plateforme pour pouvoir y retourner plus rapidement la fois suivante. L'analyse des profils d'apprentissage des rates témoins positifs montraient à la semaine 8 un processus d'apprentissage qui semble débiter plus tardivement et avec une pente significativement moins forte que les rates normales. Ceci reflète un apprentissage plus lent par ces rates, avec des latences qui restent significativement plus longues sur toute la durée de la phase, ce qui conduit à des différences très significatives sur le cumul des latences moyennes de chaque jour. Ceci suggère la présence de dysfonctionnements des réseaux neuronaux impliqués dans les processus mnésiques, induisant en conséquence du stress à l' AlCl_3 , une perte des capacités à mémoriser une nouvelle tâche. L'exploration cognitive s'achève par l'analyse de la mémoire spatiale à long terme réalisée par la restitution d'une tâche imposée aux rates après la fin de l'apprentissage. Ce test consistait à remettre les rates dans la piscine pour évaluer la mémoire spatiale à long terme reflétée par leur capacité à rejoindre l'emplacement de la plateforme (qui a été retirée pour les besoins de ce test) et/ou à la rechercher de façon insistante dans le quadrant où elle se trouvait. La mémoire est d'autant meilleure que la rate gagne rapidement l'emplacement de la plateforme et passe une grande partie du temps disponible (1 min) dans ce quadrant, y croisant donc souvent cet emplacement. Les rates du groupe témoin positif ainsi que celles traitées à la vitamine E ou celles traitées à la galantamine se distinguaient par des capacités mnésiques significativement affectées. À l'inverse, la neurotoxicité du chlorure d'aluminium semblait n'avoir induit aucun dégat ni déficit cognitif chez les rates du groupe EHEAC (150 mg/kg) qui conservaient des performances et une empreinte mnésique comparables à celles des rates normales. Les effets neuroprotecteurs attribuables à l'EHEAC consistent en l'amélioration, ou au moins la préservation, des performances cognitives de ces rates en contribuant de manière significative à conserver de façon inaltérée les capacités d'apprentissage et de mémoire à court et long terme. La plasticité cérébrale est définie comme l'ensemble des modifications durables de la constitution de réseaux neuronaux permettant de traiter l'information nécessaire aux processus d'apprentissage et de mémoire. La plasticité cérébrale inclut ainsi à la fois la plasticité synaptique et la neurogenèse. La plasticité synaptique est la capacité des neurones à modifier leurs propriétés (morphologiques, chimiques et fonctionnelles) au cours du temps. L'hippocampe a été décrit comme étant le siège de phénomènes de plasticité synaptique, notamment car celui-ci est une structure clé dans les processus d'apprentissage (Morris, 2006). La neurogenèse quant à elle est l'ensemble des processus conduisant à l'intégration fonctionnelle de nouveaux neurones dans les circuits cérébraux. Un des principaux sièges de la neurogenèse adulte est l'hippocampe. En effet, Il a

été démontré que la mémoire à court terme et la mémoire à long terme sont médiées par des changements au niveau moléculaire (Sossin, 2008). Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans le contrôle de la synthèse de nouvelles protéines comme la voie de la kinase ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) (Sweatt, 2004), qui convergent vers le facteur de transcription CREB (*cAMP-response element binding protein*). L'activation de CREB apparaît cruciale pour l'induction des changements durables de la plasticité synaptique et de la mémoire (Pham *et al.*, 1999). Les polyphénols semblent pouvoir avoir un impact sur les différentes voies de signalisations neuronales impliquées dans la plasticité synaptique (Zhang *et al.*, 2015). En effet, il a été montré que les niveaux hippocampiques de CaMKII (*calmodulin-dependent protein kinase*) phosphorylée, capable de réguler la phosphorylation de CREB (Wei *et al.*, 2002), étaient diminués chez l'animal âgé en comparaison avec des animaux adultes. À l'inverse une supplémentation avec des catéchines de thé vert était efficace pour rétablir les niveaux d'expression hippocampique de la protéine CaMKII diminués chez des souris à vieillissement accéléré (SAMP8) (Li *et al.*, 2009). De plus, la neurogenèse hippocampique a été reliée directement aux performances cognitives (Stangl et Thuret, 2009) et il est admis que le nombre de nouveaux neurones diminue avec l'âge, ou avec la MA ce qui conduit à des déficits d'apprentissage et de mémoire (Klempin et Kempermann, 2007). Dans étude, une supplémentation en flavanols induisait une amélioration de la mémoire spatiale associée à une augmentation de l'angiogenèse et de la densité des épines dendritiques mais pas de la survie des nouveaux neurones hippocampiques de souris (van Praag *et al.*, 2007). De plus, il a été observé qu'une supplémentation en resvératrol augmentait l'angiogenèse et la neurogenèse dans l'hippocampe de souris (Harada *et al.*, 2011). Nos résultats laissent supposer donc que l'administration de l'EHEAC (riche en polyphénols) (150 mg/kg) en induisant une augmentation du nombre de nouveaux neurones différenciés, aurait un impact positif sur l'enrichissement des réseaux neuronaux et plus globalement sur la plasticité cérébrale des animaux. Ces effets neurobiologiques positifs induiraient une activation de l'hippocampe et permettraient ainsi d'expliquer l'impact comportemental de l'EHEAC, à savoir l'amélioration de l'apprentissage et la mémoire des rates. Cependant des études supplémentaires seraient nécessaires pour confirmer cela.

L'administration de l'AlCl₃ (50 mg/kg) aux rates pendant 56 jours a induit une diminution significative du poids corporel des rates à la fin du traitement. Cette perte de poids corporel chez les rates refléterait un degré de toxicité systémique du traitement. Bondy *et al.* (1998) observaient également une absence de gain de poids chez les rats injectés par voie

intraventriculaire de lactate d'aluminium et suggéraient que l'Al a un effet direct sur les voies appétitives centrales (Bondy et *al.*, 1998). Nos résultats montraient également que l'AlCl₃ n'a pas d'effet significatif sur les masses relatives du cœur, foie et reins, alors qu'il diminue significativement la masse relative du cerveau. Il pourrait s'agir d'une atrophie sélective de cet organe (Sanchez-Iglesias et *al.*, 2007). L'administration concomitante de l'EHEAC a entraîné par contre un gain de poids corporel et une réduction significative de l'atrophie cérébrale. Ces résultats suggèrent une protection de l'extrait contre les effets toxiques de l'AlCl₃. Nous avons montré aussi que l'administration de l'AlCl₃ (50 mg/kg) pendant 56 jours conduit à une augmentation significative de l'ASAT plasmatique par rapport au groupe témoin. L'ASAT est particulièrement abondante au niveau du cœur, du foie, des muscles squelettiques, des reins. L'ASAT et l'ALAT sont des indicateurs de souffrance cellulaire. Une augmentation de leur concentration dans le sang serait synonyme d'atteinte hépatique. Ces enzymes sont généralement utilisées comme marqueurs précoces de toxicité hépatique, parce qu'elles apparaissent dans le sang en cas de dommages cellulaires au niveau des hépatocytes. L'administration concomitante de l'EHEAC (150 mg/kg) diminuait le taux d'ASAT plasmatique ce qui pourrait être due à son effet hépatoprotecteur (Njouendou et *al.*, 2014 ; Njouendou et *al.*, 2018).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au terme de ce travail dont l'objectif général était, d'évaluer les effets modulateurs *A. congolensis* sur quelques altérations biochimiques, neuropathologiques et cognitives associées à maladie d'Alzheimer, chez un modèle animal induit par le chlorure d'aluminium, il en ressort que :

- Les extraits (aqueux, hydroéthanolique et éthanoliques) préparés à partir de cette plante se sont révélés riches en polyphénols, flavonoïdes et sont dotés d'un bon pouvoir anti-radicalaire et chélateur de fer meilleur que la quercétine. L'extrait hydroéthanolique (EHEAC) possédant la meilleure capacité antioxydante, contient la catéchine, l'acide férulique, le taraxérol et d'autres composés non identifiés. Ces molécules seraient probablement responsables de ces propriétés anti-oxydantes importantes de l'extrait et sa capacité à prévenir le stress oxydant au niveau cérébral et périphérique chez les rates intoxiquées au chlorure d'aluminium ;
- L'extrait hydroéthanolique d'*A. congolensis* (EHEAC) améliore la transmission cholinergique en inhibant l'activité des cholinestérases ; régule l'homéostasie du calcium en agissant sur la dépolarisation neuronale et sur les courants de calcium dépendant du voltage, et en favorisant son l'efflux. L'EHEAC (150 mg/kg) est également capable d'empêcher une surcharge en cholestérol dans le cerveau tout en augmentant significativement le niveau de glycérophospholipides. Cet extrait favorise le catabolisme du glucose cérébral et par conséquent la production d'énergie nécessaire à l'activité neuronale ;
- L'EHEAC à la faible dose réduit la formation des lésions histologiques et ralentir la neurodégénérescence au niveau de l'hippocampe. Cet extrait participe également à la consolidation et la conservation des capacités d'apprentissage et de mémoires de reconnaissance et spatiale dans des conditions de vieillissement pathologique induit par le $AlCl_3$.

De manière générale ce travail de thèse a donc révélé que l'extrait hydroéthanolique d'*Austranella congolensis* riches en composés bioactifs y compris polyphénols et triterpènes pentacycliques offre aux neurones des rates les moyens d'une protection totale contre la toxicité du $AlCl_3$ et le développement d'un syndrome de déficit cognitif analogue à celui associé aux phases précoces de la maladie d'Alzheimer. Ce qui suggère de nouvelles activités biologiques des écorces de cette plante qui pourrait avoir un intérêt potentiel dans la prévention des maladies neurodégénératives telle la maladie d'Alzheimer. Compte tenu des résultats obtenus, plusieurs perspectives de travail peuvent être envisagées :

- ❑ Déterminer la fraction de composés responsable de l'efficacité de l'EHEAC

- ❑ Faire une étude protéomique afin d'évaluer les effets de l'EHEAC sur les voies métaboliques impliquées dans la signalisation du calcium, le métabolisme du cholestérol ou glucose au niveau du cerveau ;
- ❑ Evaluer l'effet de l'EHEAC sur quelques protéines synaptiques cérébrales impliquées dans la plasticité cérébrale.

REFERENCES BIBIOPHAPIQUES

- Abboud, R., Charcosset, C., and Greige-Gerges, H. (2016). Tetra- and Penta-Cyclic Triterpenes Interaction with Lipid Bilayer Membrane: A Structural Comparative Study. *J. Membr. Biol.*, 249, 327-338.
- Abolhassani, N. Leon, J., Sheng, Z., Oka, S., Hamasaki, H., Iwaki, T., Nakabeppu, Y. (2017). Molecular pathophysiology of impaired glucose metabolism, mitochondrial dysfunction, and oxidative DNA damage in Alzheimer's disease brain. *Mech Ageing Dev.*, 161, 95-104.
- Abubakar, M.G., Taylor, A., and Ferns, G.A. (2004). Regional accumulation of aluminium in the rat brain is affected by dietary vitamin E. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 18, 53-9.
- Abulrob, A., Tauskela J.S., Mealing, G., Brunette, E., Faid, K., and Stanimirovic, D. (2005). Protection by cholesterol-extracting cyclodextrins: a role for N-methyl-D-aspartate receptor redistribution. *J. Neurochem.*, 92, 1477-1486.
- Agostinho, P., Pliássova, A., Oliveira, C.R., and Cunha, R.A. (2015) Localization and Trafficking of Amyloid- β Protein Precursor and Secretases: Impact on Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.*, 45, 329–347.
- Aiyegoro, O., and Okoh, A. (2010). Preliminary phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC. *BMC Complement. Altern. Medi.*, 10, 21.
- Alzheimer's Association (2016). 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, 12, 459–509.
- Armstrong, R. (2019). Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.*, 57, 87-105.
- An, Y., Varma, V., Varma, S., Casanova, R., Dammer, E., Pletnikova, O., Chia, C., Egan, J., Ferrucci, L., Troncoso, J., Levey, A., Lah, J., Seyfried, N., Legido-Quigley, C., O'Brien, R. and Thambisetty, M. (2018). Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 14(3): 318-329.
- Anderson, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T. and O'keefe, J. (2006). *The Hippocampus Book*. New York, NY: Oxford University Press, Inc.

- Arbos, K.A., Ligia, M.C., Lucielly, B., Cid, A.M., and Almeriane, M. (2008). Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutr. Res.*, 28, 457-463.
- Arthur, J.R. (2000). The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 57, 1825-1835.
- Assob, N., Abdel, J., Pepin, E., Jean, R., Badami, M., Veeresh, P., Typpeswamy, D., and Samuel, W. (2014). *In vitro* screening of antioxidant properties of ten Cameroonian medicinal plants. *J. adv. Biol.* 3(2), 171-177.
- Aubreville, A. (1964). *Flore du Cameroun, vol. 2 (sapotacées)*. Paris, France, Muséum National d'Histoire Naturelle, 142 p.
- Augustinack, J.C., Schneider, A. Mandelkow E.M., and Hyman B.T. (2002). Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 103(1), 26-35.
- Aybek, H., Ercan, F., Aslan, D., and Sahiner, T. (2007). Determination of malondialdehyde, reduce glutathione levels and APOE4 allele frequency in late-onset Alzheimer's disease in Denizli, Turkey. *Clin. Biochem.*, 40, 172-176.
- Barbiellini, A., C., Fayosse, A., Dumurgier, J., Machado-Fragua, M. D., Tabak, A. G., van Sloten, T. (2021). Association Between Age at Diabetes Onset and Subsequent Risk of Dementia. *JAMA* 325, 1640.
- Badreddine, A., Zarrouk, A., Karym, E.M., Debbabi, M., Nury, T., Meddeb, W., Sghaier, R., Bezine, M., Vejux A., Martine, L., Grégoire, S., Bretillon, L., Prost-Camus, E., Durand, P., Prost, M., Moreau, T., Cherkaoui-Malki, M., Nasser, B., and Lizard G. (2017). Argan Oil-Mediated Attenuation of Organelle Dysfunction, Oxidative Stress and Cell Death Induced by 7-Ketocholesterol in Murine Oligodendrocytes 158N. *Int. J. Mol. Sci.*, 18(10), 2220.
- Baginski, E., Foa, P., and Zak, B. (1967). Determination of phosphate study of labile organic phosphate interference. *Clin. chim. Acta*, 15, 155-1586.
- Baky, M.H., Kamal, A.M., Elgindi, M.R., and Haggag, E.G. (2016). A Review on Phenolic Compounds from Family Sapotaceae. *J. Pharmacogn. Phytochem.*, 5(2), 280-287.

- Balasubramanian, N., Scott, D.W., Castle, J.D., Casanova, J.E., and Schwartz, M.A. (2007). Arf6 and microtubules in adhesion dependent trafficking of lipid rafts. *Nat. Cell Biol.*, 9, 1381-1391.
- Banksa, W.A., Niehoffa, M.L., Dragob, D., and Zatta, P. (2006). Aluminum complexing enhances amyloid β protein penetration of blood-brain barrier. *Brain Res.*, 1116, 215-221.
- Barone, E., Di Domenico, F., and Butterfield, D.A., (2014). Statins more than cholesterol lowering agents in Alzheimer disease: their pleiotropic functions as potential therapeutic targets. *Biochem. Pharmacol.*, 88(4), 605-616.
- Bartels, H., Böhmer, M., and Heierli, C. (1972). Serum creatinine determination without protein precipitation. *Clin. Chimi. Acta*, 37, 193-197.
- Basheer, M., Pradeep, K., Sreekumaran, E., and Ramakrishna, T. (2016). A study of serum magnesium, calcium and phosphorus level, and cognition in the elderly population of South India. *Alexandria J. Med.*, 52, 303-308.
- Bateman, R.J., Xiong, C., Benzinger, T.L.S., Fagan, A.M., Goate, A., Fox, N.C., Marcus, D.S., Cairns, N.J., Xie, X., Blazey, T.M., Holtzman, D.M., Santacruz, A., Buckles, V., Oliver, A., Moulder, K., Aisen, P.S., Ghetti, B., Klunk, W.E., McDade, E., Martins, R.N., Masters, C.L., Mayeux, R., Ringman, J.M., Rossor, M.N., Schofield, P.R., Sperling, R.A., Salloway, S., Morris, J.C., Dominantly Inherited Alzheimer Network (2012). Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med*, 367, 795–804.
- Beal, M.F. (2000). Oxidative metabolism. *Ann N Y Acad. Sci.*, 2000, 924,164-9.
- Bergmeyer, H.U., Bernt, E. (1963). Lactate dehydrogenase. *In: Bergmeyer, HU., editor. Methods of Enzymatic Analysis.* London: Academic Press; p. 574-579.
- Bergmeyer, H.U., and Bernt, E. (1974). *Methods of Enzymatic Analysis* (H.U. Bergmeyer, ed.). Academic Press (New York, NY), 2nd ed., pp. 1205-1212
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4, 517–529.

- Björkhem, I. (2006). Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J. Intern. Med.*, 260, 493-508.
- Björkhem, I., Lütjohann, D., Breuer, O., Sakinis, A., and Wennmalm, A. (1997). Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with $^{18}O_2$ techniques *in vivo* and *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, 272, 301786-30184.
- Bjorkhem, I. and Meaney, S. (2004). Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 24(5), 806-815.
- Blašková, D., Žižková, P., Držik, F., Viskupičová, J., Veverka, M., and Horáková, L. (2013). Modulation of rabbit muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity by novel quercetin derivatives. *Interdiscip. Toxicol.*, 6, 3–8.
- Bradley, M.A., Xiong-Fister, S., Markesbery, W.R., and Lovell, M.A. (2012). Elevated 4-hydroxyhexenal in Alzheimer's disease (AD) progression. *Neurobiol. Aging*, 33, 1034-1044.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food. Sci. Technol.*, 28, 25–30.
- Braverman, N., and Moser, A. (2012). Functions of Plasmalogen Lipids in Health and Disease. *BBA-Molecular Basis of Disease*, 1822, 1442-1452.
- Brawn, K. and Fridovich, I. (1980). Superoxide radical and superoxide dismutases: threat and defense. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 492, 9-18.
- Brickman, A.M., Khan, U.A., Provenzano, F.A. (2014). Enhancing dentate gyrus function with dietary flavanols improves cognition in older adults. *Nat Neurosci.*, 17(12), 1798-1803.
- Brigelius-Flohe, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 951-965.
- Brigelius-Flohé, R., (2009). Commentary: oxidative stress reconsidered. *Genes Nutr.*, 4(3), 161–3.

- Brites, P., Waterham, H.R., and Wanders, R.J. (2004). Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1636(2-3), 219-231.
- Brown, M.W., and Aggleton, J.P. (2001). Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat. Rev. Neurosci.*, 2, 51–61.
- Brundin, P., Melki, R., and Kopito, R. (2010). Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11, 301–307.
- Buée, L., Bussièrè, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 33, 95–130.
- Buée, L., and Delacourte, A. (2006). Tauopathy and Alzheimer disease: a full degenerating process. *Psychol. Neuropsychiatr. Vieil.*, 4, 261–273.
- Bursill, C.A., Abbey, M., and Roach, P.D. (2007). A green tea extract lowers plasma cholesterol by inhibiting cholesterol synthesis and upregulating the LDL receptor in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis*, 193, 86–93.
- Bursill, C.A., Roach, P.D., Bottema, C.D., and Pal, S. (2001). Green tea upregulates the low-density lipoprotein receptor through the sterol-regulated element binding protein in HepG2 liver cells. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5639–5645.
- Bush, A. I. (2003). The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.*, 26(4), 207-214.
- Butterfield, A.D., Bader M.L., and Sultana, R. (2010). Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1801(8), 924-929.
- Butterfield, D. A., Drake, J., Pocernich, C., and Castegna, A. (2001) Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid peptide. *Trends Mol. Med.*, 7(12), 548-554.
- Cahill, S. (2020). WHO's global action plan on the public health response to dementia: Some challenges and opportunities. *Aging Ment. Health*, 24, 197–199.

- Campbell, A., Becaria, A., Lahiri, D.K., Sharman, K., and Bondy S.C. (2004). Chronic exposure to Al in drinking water increases inflammatory parameters selectively in the brain. *J. Neurosci. Res.*, 75, 565–572.
- Campbell, N.L., Unverzagt, F., LaMantia, M.A., Khan, B.A., and Boustani, M.A. (2013). Risk factors for the progression of mild cognitive impairment to dementia. *Clin. Geriatr. Med.*, 29, 873-893.
- Canadian Council on Animal Care, (1993). *Guide to care and use of experimental animals*. Volume 1, 2nd Edition, ISBN:0-919087-18-3.
- Carlini, V.P. (2011). The Object Recognition Task: A New Proposal for the Memory Performance Study. *Intech Open Access Publisher*, vol 572 -667.
- Carmona, J.J. and Michan, S. (2016). Biology of Healthy Aging and Longevity. *Rev. Invest. Clin.*, 68, 7-16.
- Carrillo-Mora, P., Luna, R., & Colin-Barenque, L. (2014). Amyloid beta: multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects? *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2014, 795375.
- Carter, M., and Shieh, J.C. (2010). Animal Behavior. *In: Guide to Research Techniques in Neuroscience*. Academic Press, New York, pp. 39–71.
- Cassidy, L., Fernandez, F., Johnson, J. B., Naiker, M., Owoola, A. G., and Broszczak, D. A. (2020). Complementary Therapies in Medicine Oxidative stress in alzheimer ' s disease : A review on emergent natural polyphenolic therapeutics. *Complement. Ther. Med.*, 49, 102294.
- Castellani, R., Hirai, K., Aliev, G., Drew KL., Nunomura, A., Takeda, A., Cash, A.D., Obrenovich, M.E., Perry, G., Smith, M.A. (2002). Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.*, 70, 357–60.
- Chambon, C., Wegener, N., Gravius, A., and Danysz, W. (2011). Behavioural and cellular effects of exogenous amyloid-beta peptides in rodents. *Behav. Brain Res*, 225, 623-641.
- Chen, F.X., and Wang, LK. (2015). Effect of ferulic acid on cholesterol efflux in macrophage foam cell formation and potential mechanism. *China journal of chinese materia medica Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* ;40(3), 533-537.

- Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., Collin F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol.*, 14, 450-464.
- Chételat, G., Desgranges, B., and Eustache, F. (2006). Brain profile of hypometabolism in early Alzheimer's disease: relationships with cognitive deficits and atrophy. *Rev. Neurol. (Paris)*, 162, 945–951.
- Colizzi C. (2019). The protective effects of polyphenols on Alzheimer's disease: A systematic review. *Alzheimers Dement*, 5, 84-196.
- Collingwood, J.F., Chong, R.K.K., Kasama, T., Cervera-Gontard, L., Dunin-Borkowski, R.E., Perry, G., Pósfai, M., Siedlak, S.L., Simpson, E.T., Smith, M.A., and Dobson, J. (2008). Three-dimensional tomographic imaging and characterization of iron compounds within Alzheimer's plaque core material. *J. Alzheimers Dis. (JAD)*, 14, 235-245.
- Coronel, R., Palmer, C., Bernabeu-Zornoza, A., Monteagudo, M., Rosca, A., Zambrano, A., & Liste, I. (2019) Physiological effects of amyloid precursor protein and its derivatives on neural stem cell biology and signaling pathways involved. *Neural Regen Res.*, 14, 1661-1671
- Cosco, T.D., Howse, K., and Brayne, C. (2017). Healthy ageing, resilience and wellbeing. *Epidemiol. Psychiatr. Sci.*, 26, 579-583.
- Coskren, P.J., Luebke, J.I., Kabaso, D., Wearne, S.L., Yadav, A., Rumbell, T., Hof, P.R., and Weaver, C.M. (2015). Functional consequences of age-related morphologic changes to pyramidal neurons of the rhesus monkey prefrontal cortex. *J Comput Neurosci*, 38, 263-283.
- Cremonini, A.L., Caffa, I., Cea, M., Nencioni, A., Odetti, P., and Monacelli, F. (2019) Nutrients in the Prevention of Alzheimer's Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2019, 9874159-20.
- Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Cotelle, N., Vézin, H., Demigné, C., and Rémésy, C. (2003). The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. *Am. J. Physiol. Gastrointest., Liver Physiol.*, 284, G980–988.

- Crozier, A., Jaganath, I.B., and Clifford, M.N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.*, 26, 1001-1043.
- Cummings, J., Aisen, P., DuBois, B., Frölich, L., Clifford, R., Jack, Jr, Jones, R.W., Morris, J.C., Raskin, J., Dowsett S.A., and Scheltens, P. (2017). Drug development in Alzheimer's disease: the path to 2025. *Alzheimer's Res. Ther.*, 9, 60.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., and Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super. Sanita*, 43, 348-361.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., and Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 1321-1342.
- Datla, K.P., Christidou, M., Widmer, W.W., Rooprai, H.K., and Dexter, D.T. (2001). Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus flavonoid tangeretin in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroreport.*, 12, 3871-3875.
- Darvesh, S., Hopkins D.A., and Geula, C. (2003). Neurobiology of Butyrylcholinesterase. *Nature*, 4, 131-138.
- Davous, P., and Delacourte, A. (1999). Maladie d'Alzheimer. *Encycl Méd Chir* (Elsevier, Paris), Neurologie, 17-056-A-10,15p.
- Delaby, M-N. (2015). Alzheimer: Un régime pour prévenir la maladie. *Sciences et Avenir* .
- De la Monte, S.M., and Tong, M. (2014). Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* 88, 548–559.
- De Winter, G. (2015). Aging as disease. *Med. Health Care Philos.*, 18, 237-243.
- Di Paolo, G., and Kim, T.W. (2011). Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nat. Rev. Neurosci.* 12(5), 284-296.
- Dibo-Cohen, C.M. (2006). Memoire spatiale contextuelle et schizophrénie. *Contextual Spatial Memory and Schizophrenia*. Universite Pierre et Marie Curie—ParisVI, Français.

- Dietschy, J.M., and Turley, S.D. (2004). Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res.*, 45(8), 1375-1397.
- Dominguez, L.J. and Barbagallo, M. (2018). Nutritional prevention of cognitive decline and dementia. *Acta Biomed.*, 89, 276-290.
- Dua, R., Kumar, V., Sunkaria, A., and Gill, K.D. (2010). Altered glucose homeostasis in response to aluminium phosphide induced cellular oxygen deficit in rat. *Indian J. Exp. Biol.*, 722-730.
- Duan, J., Zhang, J., Zhao, Y., Yang, F., and Zhang, X. (2006). Ganglioside GM2 modulates the erythrocyte Ca^{2+} -ATPase through its binding to the calmodulin-binding domain and its 'receptor'. *Arch. Biochem. Biophys.*, 454, 155–159.
- Duflot, V. (2018). Les lipides dans la maladie d'Alzheimer. *OCL*, 25(4), D401.
- Dunn, A.R. and Kaczorowski, C.C. (2019). Regulation of intrinsic excitability: Roles for learning and memory, aging and Alzheimer's disease, and genetic diversity. *Neurobiol. Learn Mem.*, 164, 107069.
- Dupuy, J., Volbeda, A., Carpentier, P., Darnault, C., Moulis, J.M., and Fontecilla-Camps, J.C. (2006). Crystal structure of human iron regulatory protein 1 as cytosolic aconitase. *Structure* (London, England : 1993) 14, 129-139.
- Duyckaerts, C., Colle, M.A., Dessi, F., Piette, F., and Hauw, J.J. (1998). Progression of Alzheimer histopathological changes. *Acta Neurol. Belg.*, 98, 180–185.
- Ellman, G. (1959). Quantitative determination of peptide by sulfhydryl (-SH) groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70-77.
- Ellman, G., Courtney, K., Andres, V., Featherstone, R. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88.
- Ennaceur, A., and Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.*, 31, 47–59.
- Esiri, M.M. (2007). Ageing and the brain. *J. Pathol.* 211(2), 181-187.

- Esterbauer, H., Striegl, G., Phul, H., and Rotheneder M. (1989). Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res. Commun.*, 6, 67–75.
- Fan, X., Wheatley, E.G., & Villeda, S.A. (2017). Mechanisms of Hippocampal Aging and the Potential for Rejuvenation. *Annu. Rev. Neurosci.*, 40, 251-272.
- Farrell, E., Kaplan, L., and Pesce, A. (1984). Theory, Analysis and Correlation. The CV Mosby Company. *Magnesium in Clinical Chemistry*, 55, 1065-1670.
- Faure J.J. (1985). *Arbres des forêts denses d'Afrique Centrale*. Paris, France, Ministère des Relations extérieures, Coopération et développement, 565 p.
- Fernandez, S.M., Lewis, M.C., Pechenino, A.S., Harburger, L.L., Orr, P.T., Gresack, J.E., Schafe, G.E., and Frick, K.M. (2008). Estradiol-Induced Enhancement of Object Memory Consolidation Involves Hippocampal Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation and Membrane-Bound Estrogen Receptors. *J. Neurosci.*, 28, 8660–8667.
- Fjell, A.M., McEvoy, L., Holland, D., Dale, A.M., Walhovd, K.B., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2014). What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. *Prog. Neurobiol.*, 117, 20-40.
- Flohé, L., and Günzler, W.A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol.*, 105, 114-121.
- Foidl, B.M. & Humpel, C. (2020) Can mouse models mimic sporadic Alzheimer's disease? *Neural Regen Res*, 15, 401-406.
- Fokou, P. (2006). *Chemical investigation of three plants used in Cameroonian Traditional Medicine: Maesopsis eminii (Rhamnaceae), Aufranella congolensis (Sapotaceae) and Pentadesma grandifolia (Guttiferae)*. (Thesis, University of Bielefeld, Germany).
- Folch, J., Ascoli, I., Lees, M., Meath, J., and Le Baron, F. (1951). Preparation of lipid extracts from brain tissue. *J. Biol. Chem.*, 191, 833-841.
- Folstein, M.F., Folstein, S.E., and McHugh, P.R. (1975). “Mini-mental state”. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.*, 12, 189–198.

- Fossati, P., and Principe, L. (1982). Serum Triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces Hydrogen Peroxide. *Clin. Chem.*, 28, 2077-2080.
- Fraga, G.G., Croft, K.D., Kennedy, D.O. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct.*, 10, 514-528.
- Frankel, E.N. (1998). Lipid oxidation. *The Oily Press (vol. 10)*. Dundee, Scotland. 10.
- Franklin K.B., and Paxinos G. (1997). The mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. *Academic Press*, New York.
- Fuster-Matanzo, A., Llorens-Martín, M., Hernández, F., and Avila, J. (2013). Role of neuroinflammation in adult neurogenesis and Alzheimer disease: therapeutic approaches. *Mediators Inflamm*, 2013, 260925.
- Fyiad, A.A. (2007). Aluminium Toxicity and Oxidative Damage Reduction by Melatonin in Rats. *J. Appl. Sci. Res.*, 3, 1210-1217.
- Galan, C., Jardín, I., Dionisio, N., Salido, G., and Rosado, J.A. (2010). Role of Oxidant Scavengers in the Prevention of Ca²⁺Homeostasis Disorders. *Molecules*, 15, 7167-7187.
- Galvin, J.E., Sadowsky, C.H., and Nincds, A. (2012). Practical guidelines for the recognition and diagnosis of dementia. *J. Am. Board Fam.Med.*, 25(3), 367-382.
- Ganapathy-Kanniappan, S., and Geschwind, J.-F.H. (2013). Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects. *Mol. Cancer.*, 12, 152.
- GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators (2016) Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, 388, 1459-1544.
- GBD 2016 Dementia Collaborators (2019). Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.*, 18, 88–106.

- Gervais, E. (2019). *Évaluation de l'interaction entre les interneurons et la microglie dans la région CA1 de l'hippocampe de souris présentant les symptômes de la maladie d'Alzheimer*. (Mémoire, Université de Laval, Canada).
- Gilman, S., Koller, M., Black, R.S., Jenkins, L., Griffith, S.G., Fox, N.C., Eisner, L., Kirby, L., Rovira, M.B., Forette, F., Orgogozo J. M. and Team, A.N.S. (2005). Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology*, 64(9), 1553-1562.
- Gottfried, E., and Rapport, M. (1962). The biochemistry of plasmalogens. Isolation and charecterisation of phosphatidal choline a pure native plasmalogen. *J. Biol. Chem.*, 237, 329-333.
- Götz, J., Bodea, L.-G., and Goedert, M. (2018). Rodent models for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 19, 583-598.
- Govaerts, R., Frodin, D.G., Pennington, T.D. (2001). *World Checklist and Bibliography of Sapotaceae*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, 2001.
- Graham, W.V., Bonito-Oliva, A., and Sakmar, T.P. (2017). Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annu. Rev. Med.*, 68, 413-430.
- Guo, Y., Zhao, Y., Nan, Y., Wang, X., Chen, Y., and Wang, S. (2017). (-)-Epigallocatechin-3-gallate ameliorates memory impairment and rescues the abnormal synaptic protein levels in the frontal cortex and hippocampus in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroreport.*, 28, 590-597.
- Haass, C., and Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 101–112.
- Habeck, M., Haviv, H., Katz, A., Kapri-Pardes, E., Ayciriex, S., Shevchenko, A., Ogawa, H., Toyoshima, C., and Karlsh, S. (2015). Stimulation, inhibition, or stabilization of Na, K-ATPase caused by specific lipid interactions at distinct sites. *J. Biol. Chem.*, 290(8), 4829-4842.
- Hamilton, L.K., Dufresne, M., Joppe S.E., Petryszyn, S., Aumont, A., Calon, F., Barnabe-Heider, F., Furtos, A., Parent, M., Chaurand, P., and Fernandes, K. J.L. (2015). Aberrant

- Lipid Metabolism in the Forebrain Niche Suppresses Adult Neural Stem Cell Proliferation in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Cell Stem Cell* 17, 397–411.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third edition Oxford, Oxford Univ. Press.
- Han, X., Holtzman, D. M. and McKeel, D. W., Jr. Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *J. Neurochem.*, 77, 1168-1180 (2001).
- Harada, C.N., Natelson Love, M.C., and Triebel, K.L. (2013) Normal cognitive aging. *Clin. Geriatr. Med.*, 29, 737-752.
- Harada C.N., Zhao J., Kurihara H., Nakagata N., Okajima K. (2011). Resveratrol improves cognitive function in mice by increasing production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus. *J. Nutr. Biochem.*, 22, 1150-1159.
- Haralampiev, I., Scheidt A., Huster, D., and Müller, P. (2017). The Potential of α -Spinasterol to mimic the membrane properties of natural cholesterol, *Molecules*, 22(8), 1390.
- Harbeby, E., Pifferi, F., Jouin, M., Pélerin, H., Tremblay, S., Lecomte, R., Cunnane, A. Huertas, S.C., Alessandri, J.M., and Guesnet, P. (2012). N-3 fatty acids, neuronal activity and energy metabolism in the brain. *Ol. Corps Gras Lipides*, 19, (4), 238-244.
- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S.G., Croteau, D.L., and Bohr, V.A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol*, 1, 444-17.
- Hsieh, R.J., and Kinsella, J.E. (1989). Lipoxygenase Generation of Specific Volatile Flavor Carbonyl Compounds in Fish Tissues. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 279-286.
- Hsu, T.M. and Kanoski, S.E. (2014) Blood-brain barrier disruption: mechanistic links between Western diet consumption and dementia. *Front. Aging Neurosci.*, 6, 88.
- Huang, W.J., Zhang, X., and Chen, W.W. (2016). Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed. Rep.*, 4(5), 219-522.
- Hulbert, A.J. (2010). Metabolism and longevity: is there a role for membrane fatty acids? *Integr. Comp. Biol.* 50, 808-817.

- Hutter-Paier, B., Huttunen, H.J., Puglielli, L., Eckman, C.B. Kim, D.Y., Hofmeister, A., Moir, R.D., Domnitz, S.B., Frosch, M.P., Windisch, M. (2004). The ACAT inhibitor CP-113,818 markedly reduces amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron*, *44*, 227-238.
- Huttunen, H.J., Havas, D., Peach, C., Barren, C., Duller, S., Xia, W., Frosch, M.P., Hutter-Paier, B., Windisch, M., and Kovacs, D.M. (2010). The acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitor CI-1011 reverses diffuse brain amyloid pathology in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, *69*, 777-788.
- Iqbal, K., Alonso, A.D., Gondal, J.A., Gong, C.X., Haque, N., Khatoon, S., Sengupta, A., Wang, J.Z., and Grundke-Iqbal, I. (2000). Mechanism of neurofibrillary degeneration and pharmacologic therapeutic approach. *J. Neural Transm. Suppl.*, *59*, 213–222.
- Iqbal, K. and Grundke-Iqbal, I. (2010). Alzheimer's disease, a multifactorial disorder seeking Multitherapies. *Alzheimers Dement.*, *6*, 420–424.
- Iqbal, K., Liu, F., and Gong, C.-X. (2016) Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat. Rev. Neurol.*, *12*, 15-27.
- Jamilia, N., Khairuddean, M., Yeong, K.K., Osman, H., and Murugaiyah, V. (2015). Cholinesterase inhibitory triterpenoids from bark of *Garcinia hombroniana*. *J Enzyme Inhib. Med. Chem.*, *30* (1), 133-139.
- Jankowsky, J.L., Slunt, H.H., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Borchelt, D.R. (2004). APP processing and amyloid deposition in mice haplo-insufficient for presenilin 1. *Neurobiol. Aging*, *25*, 885–892.
- Jankowsky, J.L., Slunt, H.H., Ratovitski, T., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Borchelt, D.R. (2001). Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol. Eng.*, *17*, 157–165.
- Jaroudi, W., Garami, J., Garrido, S., Hornberger, M., Keri, S., and Moustafa, A.A. (2017). Factors underlying cognitive decline in old age and Alzheimer's disease: the role of the hippocampus. *Rev. Neurosci.*, **28**, 705-714.

- Jazi, R., Lalonde, R., Qian, S., and Strazielle, C. (2009). Regional brain evaluation of acetylcholinesterase activity in PS1/A246E transgenic mice. *Neurosci. Res.* 63,106–114.
- Jelenković, A., Jovanović, M.D., Stevanović, I., Petronijević, N., Bekonjić, D., Zivković, J. Igić, R. (2013). Influence of the green tea leaf extract on neurotoxicity of aluminium chloride in rats. *Phytother. Res.*, 28, 82-87.
- Jeong, W., Lee, H., Cho, S., and Seo, J. (2019). ApoE4-Induced Cholesterol Dysregulation and Its Brain Cell Type-Specific Implications in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Mole. Cells*, 42, 739-746.
- Jongsiriyanyong, S. and Limpawattana, P. (2018). Mild Cognitive Impairment in Clinical Practice: A Review Article. *Am. J. Alzheimers Dis. Other. Demen.*, 33, 500-507.
- Kanner, J., German, J.B., and Kinsella, J.E. (1987). Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Food Sci. Nutr.*, 25, 317.
- Kanski, J., Aksenova, M., Stoyanova, A., and Butterfield, D.A. (2004). Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: Structure-activity studies. *J. Nutr. Biochem.*, 13, 273–281.
- Karran, E., Mercken, M., & de Strooper, B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.*, 10, 698–712.
- Kawahara, M., and Kato-Negishi, M. (2011). Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease : the integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses. *Int. J. Alzheimers Dis.*, 8, 276-393.
- Khalid, S., Al-Numair, Veeramani, C., Alsaif, M.A., and Chandramohan G. (2015). Influence of kaempferol, a flavonoid compound, on membrane-bound ATPases in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharm. Biol.*, 53, 1372–1378.
- Khallouki, F., Younos, C., Soulimani, R., Oster, T., Charrouf, Z., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., and Owen R.W. (2003). Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *Eur. J. Cancer Prev.*, 12, 67-75.

- Khan, M.T.H., Orhan, I., Şenol, F.S., Kartal, M., Sener, B., Dvorska, M., Smejkal, K., Slapetova, T. (2009). Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chem. Biol. Interact.*, 181,383-389.
- Kim, H.K., Kim, M., Kim, S., Kim, M., and Chung, J.H. (2004). Effects of green tea polyphenol on cognitive and acetylcholinesterase activities. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 1977–1979.
- Kirkman, H.N., Rolfo, M., Ferraris, A.M. and Gaetani, G.F. (1999). Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J. Biol. Chem.*, 274, 13908-13914.
- Klempin F., Kempermann G., (2007). Adult hippocampal neurogenesis and aging. *Eur. Arch. Psychiatry Clin., Neurosci.*, 257, 271-280.
- Knierim, J.J. (2015). The hippocampus. *Curr. Biol.*, 25, R1116–R1121.
- Knopman, D.S., Haeberlein, S.B., Carrillo, M.C., Hendrix, J.A., Kerchner, G., Margolin, R., Maruff, P., Miller, D.S., Tong, G., Tome, M.B., Murray, M.E., Nelson, P.T., Sano, M., Mattsson, N., Sultzer, D.L., Montine, T.J., Jack, C.R., Kolb, H., Petersen, R.C., Vemuri, P., Canniere, M.Z., Schneider, J.A., Resnick, S.M., Romano, G., van Harten, A.C., Wolk, D.A., Bain, L.J., and Siemers, E. (2018). The National Institute on Aging and the Alzheimer’s Association Research Framework for Alzheimer’s disease: Perspectives from the Research Roundtable. *Alzheimers Dement*, 14, 563-575.
- Komolafe, K., Akinmoladun, A.C., Komolafe, T.R., Olaleye, M.T., Boligon, A.A., Akindahunsi, A.A., and Rocha, B.T. (2018). Angiotensin-1-converting enzyme inhibition, antioxidant activity, and modulation of cerebral Na⁺/K⁺ ATPase by free phenolics of African locust bean (*Parkia biglobosa*). *Health Sci. Rep.*, 1, e17.
- Krebs, H.A., and Holzach, O. (1952). The conversion of citrate into cis-aconitate and isocitrate in the presence of aconitase. *Biochem. J.*, 52, 527-528.
- Lane, C.A., Hardy, J., and Schott, J.M. (2018). Alzheimer’s disease. *Eur. J. Neurol.*, 25, 59–70.

- Langness, V. F., van der Kant, R., Das, U., Wang, L., and Chaves, R. (2021). Cholesterol-lowering drugs reduce APP processing to A β by inducing APP dimerization. *Mol. Biol. Cell.* 32, 247–259.
- Lester, A.W., Moffat, S.D., Wiener, J.M., Barnes, C.A., and Wolbers, T. (2017). The Aging Navigational System. *Neuron.*, 95, 1019-1035.
- Li, L., Xiao, N., and Yang, X. (2012) A high cholesterol diet ameliorates hippocampus-related cognitive and pathological deficits in ovariectomized mice. *Behav., Brain Res.*, 230(1), 251-258.
- Lin, T.Y., Lu, C.W., Huang, S.-K., Wang, S.-J. (2013). Ferulic acid suppresses glutamate release through inhibition of voltage-dependent calcium entry in rat cerebrocortical nerve terminals. *J. Med. Food*, 16 (2), 112-119.
- Lopez Sanchez, M.I.G., van Wijngaarden, P., & Trounce, I.A. (2019). Amyloid precursor protein-mediated mitochondrial regulation and Alzheimer's disease. *Br. J. Pharmacol*, 176, 3464-3474.
- Lovell, M.A., Robertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L., and Markesbery, W.R. (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J. Neurol. Sci.*, 158, 47-52.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., and Randall, R. (1951). Protein measurement with the phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 193(1), 265-275.
- Luine, V.N., Jacome, L.F., and MacLusky, N.J. (2003). Rapid Enhancement of Visual and Place Memory by Estrogens in Rats. *Endocrinology*, 144, 2836–2844.
- Luo, J., and Shi, R. (2005). Acrolein induces oxidative stress in brain mitochondria. *Neurochemistry*, 46, 243-252.
- Lupo, G., Gaetani, S., Cacci, E., Biagioni, S., and Negri, R. (2019). Molecular Signatures of the Aging Brain: Finding the Links Between Genes and Phenotypes. *Neurotherapeutics*, 16, 543-553.
- Lushchak, O.V., Piroddi, M., Galli, F., and Lushchak V.I. (2014). Aconitase post-translational modification as a key in linkage between Krebs cycle, iron homeostasis, redox signaling, and metabolism of reactive oxygen species. *Redox Report*, 19:1, 8-15.

- Magi, S., Castaldo, P., Macrì, M.L., Maiolino, M., Matteucci, A., Bastioli, G., Gratteri, S., Amoross., and Lariccia V. (2016). Intracellular Calcium Dysregulation: Implications for Alzheimer's Disease. *Biomed Res. Int.*, 2016, 14.
- Mahley, R. W. (2016). Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. *J. Mol. Med.*, 94, 739-746.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., and Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79, 727-747.
- Marquer, C., Laine, J., Dauphinot, L., Hanbouch, L., Lemerrier-Neuillet, C., Pierrot, N. (2014). Increasing membrane cholesterol of neurons in culture recapitulates Alzheimer's disease early phenotypes. *Mol. Neurodegener.*, 9, 60.
- Martins, I.J., Berger, T., Sharman, M.J., Verdile, G., Fuller, S.J., and Martins, R.N. (2009). Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 111, 1275-1308.
- Mattson, M.P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I., and Rydel, R.E. (1992). beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.*, 12, 376-389.
- Mattson, M., Gleichmann, M., and Cheng A. (2008). Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron*. 60, 748-766.
- Matsumura, N., Takami, M., Okochi, M., Wada-Kakuda, S., Fujiwara, H., Tagami, S., Funamoto, S., Ihara, Y., and Morishima-Kawashima, M. (2014). gamma-Secretase associated with lipid rafts: multiple interactive pathways in the stepwise processing of beta-carboxyl-terminal fragment. *J. Biol. Chem.*, 289(8), 5109-5121.
- Mayer, M.L., and Westbrook, G.L. (1987) Cellular mechanisms underlying excitotoxicity. *Trends Neurosci.*, 10, 59-61
- Mbolo, M., (1991). *Germination et croissance des espèces forestières du Sud-Cameroun, exemple de quelques légumineuses et sapotaceae.* (Thèse de 3è cycle, Université de Yaoundé I, Cameroun, 268p).

- McCord, J.M., and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *J. Biol. Chem.*, *244*, 6049-6055.
- McCord, J.M., Keele, B.B., J.R., and Fridovich, I. (1971). An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *68*, 1024-1027.
- McHugh, D. and Gil, J. (2018). Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J. Cell Biol.*, *217*, 65-77.
- Michel, T. (2011). *Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (Hippocastanum ssp. rhamnoides)*. (Thèse de Doctorat de l'Université d'Orléans, 76-86).
- Micheau, J. and Marighetto, A. (2011). Acetylcholine and memory: a long, complex and chaotic but still living relationship. *Behav. Brain Res.*, *221*, 424-429.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., and Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.*, *84*, 407-412..
- Minotti, G., and Aust, S. D. (1987). An investigation into the mechanism of citrate-Fe²⁺-dependent lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.*, *3*, 379-387.
- Miranda, S., Opazo, C., Larrondo, L.F., Muñoz, F.J., Ruiz, F., Leighton F., and Inestrosa, N.C. (2000). The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.*, *62*, 633-648.
- Mishra, O.P., Delivoria-Papadopoulos, M., Cahillane G., and Wagerle, L.C. (1989). Lipid peroxidation as the mechanism of modification of the affinity of the Na⁺, K⁺-ATPase active sites for ATP, K⁺, Na⁺, and strophanthidin in vitro. *Neurochem. Res.*, *14*, 845-51.
- Misra, P., and Fridovich, I. (1972). The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *The journal of biochemistry (JB)*, *247*, 3170-3175.
- Mhamdi, A., and Van Breusegem, F. (2018). Reactive oxygen species in plant development. *Development*, *145*, dev164376.

- Mogensen, J., Christensen, L.H., and Johansson, A. (2002). Place learning in scopolamine treated rats: the roles of distal cues and catecholaminergic mediation. *Neurobiol. Learn Mem.*, 78, 139-166.
- Mori, T., Koyama, N., Tan, J., Segawa, T., Maeda, M., and Town, T. (2019). Combined treatment with the phenolics (-)-epigallocatechin-3-gallate and ferulic acid improves cognition and reduces Alzheimer-like pathology in mice. *J. Biol. Chem.*, 294(8), 2714-2731.
- Morris R.G., 2006. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *Eur. J. Neurosci.*, 23, 2829-2846.
- Morris, R.G, Garrud, P., and Rawlins, J.N. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297, 681-683.
- Mosconi, L. (2005). Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 32, 486–510.
- Moser, M.-B., Rowland, D.C., and Moser, E.I. (2015). Place cells, grid cells, and memory. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.*, 7, a021808.
- Moss, R., Mao, Q., Taylor, D., and Saucier C. (2013). Investigation of monomeric and oligomeric wine stilbenoids in red wines by ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, 27(16),1815-1827.
- Moussa C., Hebron M., Huang X., (2017) Resveratrol regulates neuro-inflammation and induces adaptive immunity in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation*, 14(1):1.
- N'Go, P.K., Azzaoui, F.Z., Soro, P.R., Samih, M., Ahami, A.O.T., Najimi, M. and Chigr, F. (2013). Developmental Effects of Malathion Exposure on Recognition Memory and Spatial Learning in Males Wistar Rats. *JBBS*, 3, 331-340.
- Naidu, N.R., Bhat, S, and Dsouza U. (2013). Effect of long term administration of aluminium chloride on oxidative stress and acetylcholinesterase activity in rat brains. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.*, 3, 616–22.

- Natiya, S., Nandhini, and Senthil, K. (2012). Neuroprotective role of *Salacia oblonga* extract against aluminum chloride induced oxidative stress in rat cortex. *J. Pharm. Res.*, 5(8), 4344-4347.
- Newington, J.T., Rappon, T., Albers, Wong, D.Y., Rylett, and Cumming, R.C. (2012). Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 1 and lactate dehydrogenase A in nerve cells confers resistance to amyloid beta and other toxins by decreasing mitochondrial respiration and ROS production. *J. Biol. Chem.*, 287, 37245–58.
- Ngandu, T., Lehtisalo, J., Solomon, A., Levälähti, E., Ahtiluoto, S., Antikainen, R., Bäckman, L., Hänninen, T., Jula, A., Laatikainen, T., Lindström, J., Mangialasche, F., Paajanen, T., Pajala, S., Peltonen, M., Rauramaa, R., Stigsdotter-Neely, A., Strandberg, T., Tuomilehto, J., Soininen, H., & Kivipelto, M. (2015). A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): a randomised controlled trial. *Lancet*, 385, 2255-2263.
- Ngo, T.S. and Li, M.S. (2012). Top-leads from natural products for treatment of Alzheimer's disease: docking and molecular dynamics study. *Mol. Simul.* 39, 279-291
- Nieweg, K., Schaller H., and Pfrieder, F.W. (2009). Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J. Neurochem.*, 109(1), 125-134.
- Niu, P.Y., Niu, Q., Zhang, Q.L., Wang, L.P., He, S.E., and Wu, T.C. (2005). Aluminium impairs rat neural cell mitochondria in vitro. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 18, 683–689.
- Njouendou, A.J., Nkeng, A., Assob, J., Chouna, J., Veerapur, V., Thippeswamy, B., Badami, S., and Wanji S. (2014). Protective effect of *Austranella congolensis* and *Sapium ellipticum* stem bark extracts against Hepatotoxicity induced by thioacetamide. *pharmacologyonlines*, 2, 38-47.
- Nugent, A. A., Lin, K., van Lengerich, B., Lianoglou, S., Przybyla, L., Davis, S. S. (2020). TREM2 Regulates Microglial Cholesterol Metabolism upon Chronic Phagocytic Challenge. *Neuron*, 105, 837.e–854.e.
- Njouendou, A.J., Clement, J., Assob, N., Tabougua, M.O., Mbarawa, K., Nde-Fon, P., Penlap, B.V., Badami S., Wanji, S., and Nkeng-Efouet, A.P. (2018). Hepatoprotective activities of

- Autranella congolensis* and *Sapium ellypticum* against carbone tetrachloride induced liver injuries in rats. *Inves. Med. Chem. Pharmacol.* 1(1), 11.
- Olayinka, O.O., and Mbuyi, N.N. (2014). Epidemiology of Dementia among the Elderly in Sub-Saharan Africa. *Int. J. Alzheimer's Dis.*, 2014, 15.
- Oliveira, L.C, Hankerson, S.J., Dietz J.M., and Raboy, B.E. (2010). Key tree species for the golden-headed lion tamarin and implications for shade-cocoa management in southern Bahia, Brazil. *Anim. Conserv.*, 13, 60-70.
- Oliver, C.N., Ahn, B.W., Moerman, E.J., Goldstein, S., and Stadtman, E.R. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem.*, 262(12), 5488-5491
- Oluseye, A., Ogunbayo, R.M., Harris, Waring, R.H., Christopher, J., Kirk and Michelangeli, F. (2008). Inhibition of the Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase by Flavonoids: A Quantitative Structure-activity Relationship Study IUBMB. *Life*, 60, 853–858.
- Oshima, E.I., Ishihara, T., Yokota, O., Nakashima-Yasuda, H., Nagao, S., Ikeda, C., Naohara, J., Terada, S., and Uchitomi, Y. (2013). Tau Aggregation, Apoptosis and Neurological Dysfunction Caused by Chronic Oral Administration of Aluminum in a Mouse Model of Tauopathies. *Brain. Pathol.*, 23(6), 633-44.
- Otaegui-Arrazola, A., Amiano, P., Elbusto, A., Urdaneta, E., and Martínez-Lage, P. (2014). Diet, cognition, and Alzheimer's disease: food for thought. *Eur. J. Nutr.*, 53(1), 1-23.
- Pandya, J., Dave, K., and Katyare, S. (2004). Effect of long-term aluminum feeding on lipid/phospholipid profiles of rat brain myelin. *Lipids Health Dis.*, 3, 13.
- 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 Med.*, 78, 1614-1619.
- Patočka, J. (2003). Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *J. Appl. Biomed.*, 1, 7-12.
- Pennington, T.D. (1990). *Sapotaceae. Flora Neotropica Monograph 52*. New York Botanical Garden Press, New York, 770 pp.

- Petersen, R.C. (2016). Mild Cognitive Impairment. *Continuum (Minneapolis, Minn)*, 22, 404-418.
- Petrov, A. M., and Pikuleva, I. A. (2019). Cholesterol 24-Hydroxylation by CYP46A1: Benefits of Modulation for Brain Diseases. *Neurotherapeutics*, 16, 635-648.
- Pettersson, A.F., Engardt, M., Wahlund, LO. (2002). Activity and balance in subjects with mild Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Dis.*, 13, 213-216.
- Pike, C.J., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G., and Cotman, C.W. (1991). Aggregation-related toxicity of synthetic beta-amyloid protein in hippocampal cultures. *Eur. J. Pharmacol.*, 207, 367-368.
- Pohl, E.E. and Jovanovic, O. (2019). The Role of Phosphatidylethanolamine Adducts in Modification of the Activity of Membrane Proteins under Oxidative Stress. *Molecules*, 24, 4545.
- Polydoro, M., Dzhala, V.I., Pooler, A.M., Nicholls, S.B., McKinney, A.P., Sanchez, L., Pitstick, R., Carlson, G.A., Staley, K.J., Spires-Jones, T.L., and Hyman, B.T. (2014). Soluble pathological tau in the entorhinal cortex leads to presynaptic deficits in an early Alzheimer's disease model. *Acta Neuropathol.*, 127(2), 257-270.
- Prieto P., Pineda, M., and Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex : specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.*, 269, 337-341.
- Prince, M.J., Wimo, A., Guerchet, M.M., Ali, G.C., Wu, Y-T., and Prina, M. (2015). World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia: An Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends. *Alzheimer's Disease International: London, UK*, 2015.
- Prince, M., Ali, G-C., Guerchet, M., Prina, A.M., Albanese, E., and Wu, Y.T. (2016). Recent global trends in the prevalence and incidence of dementia, and survival with dementia. *Alzheimer's Res. Ther.*, 8, 23.
- Puntel, R.L., Nogueira, C.W., and Rocha, J.B.T. (2005). Krebs cycle intermediates modulate thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in rat brain in vitro. *Neurochem. Res.*, 30, 225-235.

- Querfurth, H.W., and LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.*, 362(4), 329-344.
- Rajaram, S., Jones J., Lee G.J. (2019). Plant-Based Dietary Patterns, Plant Foods, and AgeRelated Cognitive Decline. *Adv. Nutr.*, 10(Suppl_4): S422-S436.
- Ramírez-Amaya, V, Balderas, I., Sandoval, J., (2001). Spatial Long-Term Memory Is Related to Mossy Fiber Synaptogenesis. *J. Neurosci.*, 21, 7340-7348.
- Reddy, M.P., and Philip, H.G. (1992). Changes in the levels of respiration and ions in the tissues of freshwater fish, under fenvalerate stress. *Chemosphere*, 25, 843–52.
- Regan, P., Whitcomb, D.J., & Cho, K. (2017). Physiological and Pathophysiological Implications of Synaptic Tau. *Neuroscientist*, 23, 137-151.
- Reitman, S., and Frankel, S. (1957). Dosage des transaminases sériques. *Am. J. Clin. Pathol.*, 28, 56.
- Reitz, C., Brayne, C., and Mayeux, R. (2011) Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.*, 7, 137–152.
- Rhee, K.S. (1988). Enzymic and nonenzymic catalysis of lipid oxidation in muscle foods. *Food Technol.*, 127-132.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 933-956.
- Richmond, W. (1973). Preparation and properties of a cholesterol oxydase from *Norcadia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin. Chem.*, 1973(19), 476-482.
- de Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C., and Brinkman, U.A.T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J Chromatogr. A* 1112, 31-63.
- Rodriguez, S., Garda, H., Heinzen, H., and Moyna, P. (1997). Effect of plant monofunctional pentacyclic triterpenes on the dynamic and structural properties of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. *Chem. Phys. Lipids*, 89, 119-130.

- Rohn, T., Hinds, T., and Vincenzi, F. (1993). Ion transport ATPases as targets for free radical damage. Protection by an Aminosteroid of the Ca²⁺ Pump ATPase and Na⁺/K⁺ Pump ATPase of Human Red Blood Cell Membranes. *Biochem. Pharmacol.*, *46*, 525-534.
- Rondeau, V., Jacqmin-Gadda, H., Commenges, D., Dartigues, J.F. (2001). Re: aluminum in drinking water and cognitive decline in elderly subjects: the Paquid cohort. *Am. J. Epidemiol.*, *154*, 288-290.
- Rooke, K., Talbot, C., James, L., Anand, R., Hardy, J.A., and Goate, A.M. (1993). A physical map of the human APP gene in YACs. *Mamm. Genome* *4*, 662–669.
- Saez, G.T., and Estan-Capell, N. (2014). Antioxidant Enzymes. In : Schwab M. (eds) *Encyclopedia of Cancer*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Salthouse, T.A. (2009). When does age-related cognitive decline begin? *Neurobiol. Aging*, *30*, 507–514.
- Samih M., N’Go, P.K., Belaaouja, S., Touhami, A.O., and Ahami A.O. (2017). Effect of Dimethoate on Object Recognition Memory in Wistar Rats and Essay of Treatment with Nettle. *Behav. Brain Sci.*, *7*, 425-445.
- Samy D.M., Ismail CA, Nassra R.A. (2016) Downstream modulation of extrinsic apoptotic pathway in streptozotocin-induced Alzheimer’s dementia in rats: Erythropoietin versus curcumin. *Eur. J. Pharmacol.* **770**, 52–60.
- Sanchez-Iglesias, S., Soto-Otero, R., Iglesias-Gonzalez, J., Barciela-Alonso, M.C., Bermejo-Barrera, P., and Mendez-Alvarez, E. (2007). Analysis of brain regional distribution of aluminium in rats via oral and intraperitoneal administration. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, *21*, 31-4.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri-Jose, A., and Saura-Calixto, F. (1998). Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *J. Sci.Food Agric.*, *76*, 270-276.
- Sarin, S., Gupta, V., and Gill, K. (1997). Alterations in lipid composition and neuronal injury in primates following chronic aluminium exposure. *Biol.Trace Elem. Res.*, *59*, 133-143.

- Sawadogo, W.R., Schumacher, M., Teiten, M.H., Dicato, M., and Diederich, M. (2012). Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy. *Biochem. Pharmacol.*, 84(10), 1225-40.
- Sawai, S, and Saito, K. (2011). Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants. *Front. Plant Sci.* 2, 1-8.
- Scarpini, E., Scheltens, P., and Feldman, H. (2003) Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *Lancet Neurol.*, 2, 539-547.
- Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000). Fluoro-Jade B: High affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.*, 874, 123-130.
- Schreurs, B.G. (2010). The effects of cholesterol on learning and memory. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 34, 1366-1379.
- Senault, C., Yazbeck, J., Goubern, M., Portet, R., Vincent, M., and Gallay, J. (1990). Relation between membrane phospholipid composition, fluidity and function in mitochondria of rat brown adipose tissue: Effect of thermal adaptation and essential fatty acid deficiency. *Biochim. Biophys. Acta*, 1023, 283-289.
- Sethi P., Jyoti, A., Singh R, Hussain, E., and Sharma, D. (2008). Aluminium-induced electrophysiological, biochemical and cognitive modifications in the hippocampus of aging rats. *Neuro. Toxicology*, 29, 1069–1079.
- Sgarbossa, A., Giacomazza, D., and di Carlo, M. (2015). Ferulic Acid : A Hope for Alzheimer's Disease Therapy from Plants. *Nutrients*,7(7), 5764-82.
- Shah R. (2013). The Role of Nutrition and Diet in Alzheimer Disease: A Systematic Review. *J. Am. Med. Dir. Assoc.*, 14(6), 398-402.
- Shobab, L.A., Hsiung, G.-Y.R., and Feldman, H.H. (2005). Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.*, 4, 841-852.
- Silva, M.V.F., Loures, C. de M.G., Alves, L.C.V., de Souza, L.C., Borges, K.B.G., & Carvalho, M.D.G. (2019). Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *J. Biomed. Sci.*, 26, 33-11.

- Simons, K., and Gerl, M.J. (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 11(10), 688-699.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, 569-572.
- Singla, N., and Dhawan, D.K. (2014). Zinc modulates aluminium-induced oxidative stress and cellular injury in rat brain. *Metallomics*, 6, 1941-1950.
- Singleton, V., and Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am.J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158.
- Sinha, K. (1972). Colorimetric assay of catalase. *Anal. Biochem.*, 47, 389-394.
- Skaper, S.D. (2012). Alzheimer's disease and amyloid: culprit or coincidence? *Int Rev Neurobiol*, 102, 277-316.
- Smiley, J.F., Morrell F., and Mesulam, M.M. (1997). Cholinergic synapses in human cerebral cortex: an ultrastructural study in serial sections. *Exp. Neurol.*, 144, 2, 361-8.
- Smith, M.A., Rottkamp, C.A., Nunomura, A., Raina, A.K., and Perry, G. (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1502, 139-144.
- Sossin W.S., (2008). Defining memories by their distinct molecular traces. *Trends Neurosci.*, 31, 170-175.
- Spencer, J.P.E. (2008). Flavonoids: modulators of brain function? *Br. J. Nutr.*, 99 E Suppl 1, ES60-77.
- Spencer, J. P. (2010). Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *Proc. Nutr. Soc.*, 69:244-260.
- Sreejayan, and Rao, M.N.A. (1997). Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J. Pharm. Pharmacol.*, 49, 105-107.
- Stangl D., and Thuret S. (2009). Impact of diet on adult hippocampal neurogenesis. *Genes Nutr.* 4, 271-282.
- Starkov, A. (2010). Measurement of Mitochondrial ROS Production. *Methods in Molecular Biology. Clifton, N.J.*, 648, 245-55.

- Stern, J., and Lewis, W.H. (1957). The colorimetric estimation of calcium in serum with O-cresolphthalein complexone. *Clin. Chim. Acta*, 2, 578-580.
- Stewart, J. (1980). Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.*, 104, 10-14.
- Stobbe, M.D., Houten, S.M., van Kampen, A.H.C., Wanders, R.J., and Moerland, P.D. (2012). Improving the description of metabolic networks: the TCA cycle as example. *FASEB J.*, 26, 3625–3636.
- Stocker, R. (1999). The ambivalence of vitamin E in atherogenesis. *Trends Biochem. Sci.*, 24, 219–23.
- Sultana, R., Perluigi, M., and Butterfield, D.A. (2012) Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: A redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radic., Biol., Med.*, 5849(12)01161-6.
- Sumathi, T., Shobana, Mahalakshmi, C.S., Sureka, V.R., Subathra, R.C., Vishali M., and Krishnamoorthi A. (2013). Oxidative stress in brains of male rats intoxicated with aluminium and neuro-modulating effect of *Celastrus paniculatus* alcoholic seed extract. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 6, 80–90.
- Sun, J.S., Tsuang, Y.W. Chen, J.J., Yang, Y.S., and Lu, F.J. (1998). An ultra-weak chemiluminescence study on oxidative stress in rabbits following acute thermal injury. *Burrus*, 24, 225-231.
- Suvarna, K., Layton, C., and Bancroft, J.D. (2019). Bancroft's theory and practice of histological techniques 9th edition. *Elsevier*. 557 p.
- Sweadner, K.J. (1991). Overlapping and diverse distribution of Na-K APTase isozymes in neurons and glia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 70, S255-S259.
- Sweatt, J.D., (2004). Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 14, 311-317.
- Swenson, U., and Anderberg, A.A. (2005). *The International Journal of the Willi Hennig Society*. Cladistics.; 21, 101-130.

- Symonowicz, M., and Kolanek, M. (2012). Flavonoids and their properties to form chelate Complexes. *Biotechnol. Food Sci.*, 76, 35-41.
- Talita, E., BertéAna, P., Dalmagroab, P., Laiz Z., Ana E., Gonçalvesab C., Meyre-Silvaab C., Bürgera, C.J., Webera D., Adolfodos S.V., Cechinel-Filhoab, M.M., and de Souzaab. (2018). Taraxerol as a possible therapeutic agent on memory impairments and Alzheimer's disease: Effects against scopolamine and streptozotocin-induced cognitive dysfunctions. *Steroids*, 132, 5-11.
- Tamagano, E., Robino, G., Obbili, A., Bardini, P., Aragno, M., Parola, M. and Danni, O. (2003). H₂O₂ and 4-hydroxynonenal mediate amyloid b-induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38MAPK. *Exp. Neurol.*, 180, 144-155.
- Tang, D., Dean, W.L., Borchman, D., and Paterson, C.A. (2006). The influence of membrane lipid structure on plasma membrane Ca²⁺-ATPase activity. *Cell. Calcium*, 39, 209–216.
- Tayeb, H.O., Yang, H.D., Price, B.H., and Tarazi, F.I. (2012). Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacol. Ther.*, 134, 8-25.
- Teixeira, N., Azevedo, J. Mateus N., and de Freitas V. (2016). Proanthocyanidin screening by LC–ESI-MS of Portuguese red wines made with teinturier grapes. *Food Chem.*, 190, 300-307.
- Tini, G., Scagliola, R., Monacelli, F., La Malfa, G., Porto, I., Brunelli, C. (2020). Alzheimer's Disease and Cardiovascular Disease: A Particular Association. *Cardiol. Res. Pract.*, 2020, 2617970.
- Thal, D.R., Rub, U., Orantes, M., and Braak H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, 58(12), 1791-1800.
- Tomás-Barberán, F.A., and Clifford, M.N. (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agri.*, 80, 1024-1032.
- Tomiyaama, T. (2010). Involvement of beta-amyloid in the etiology of Alzheimer's disease. *Brain Nerve Shinkei Kenkyū No Shinpo*, 62, 691–699.
- Tomlinson, B.E., Blessed, G., and Roth, M. (1970). Observations on the brains of demented old people. *J. Neurol. Sci.*, 11, 205–242.

- Tönnies, E., and Trushina, E. (2017). Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.*, 57, 1105–1121.
- Tremblay, C., François, A., Delay, C., Freland, L., Vandal, M., Bennett, D.A., and Calon, F. (2017). Association of Neuropathological Markers in the Parietal Cortex With Antemortem Cognitive Function in Persons With Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 275, 204.
- Tripathi, S., Mahdi, A.A., Nawab, A., Chander, R., Hasan, M., Siddiqui, M.S., Mahdi, F., Mitra, K., and Bajpai, V.K. (2009). Influence of age on aluminum induced lipid peroxidation and neurolipofuscin in frontal cortex of rat brain: a behavioral, biochemical and ultrastructural study. *Brain Res.*, 9, 107-116.
- Tromp, D., Dufour, A., Lithfous, S., Pebayle, T., and Després, O. (2015). Episodic memory in normal aging and Alzheimer disease: Insights from imaging and behavioral studies. *Ageing Res. Rev.*, 24, 232-262.
- Vandal, M., White, P.J., Tremblay, C., St-Amour, I., Chevrier, G., Emond, V., Lefrancois, D., Virgili, J., Planel, E., Giguere, Y., Marette, A., and Calon, F. (2014) Insulin reverses the high-fat diet-induced increase in brain A β and improves memory in an animal model of Alzheimer disease. *Diabetes*, 63, 4291-4301.
- van der Kant, R., Langness, V. F., Herrera, C. M., Williams, D. A., Fong, L. K., Leestemaker, Y. (2019). Cholesterol Metabolism Is a Druggable Axis that Independently Regulates Tau and Amyloid- β in iPSC-Derived Alzheimer's Disease Neurons. *Cell Stem Cell.*, 24, 363.e–375.e.
- van Praag, H., Lucero, M.J., Yeo, G.W., Stecker., K., Heivand, N., Zhao, C., Yip, E., Afanador, M., Schroeter, H., Hammerstone, J., and Gage, F.H. (2007). Plant-derived flavanol (–)epicatechin enhances angiogenesis and retention of spatial memory in mice. *J. Neurosci.*, 27, 5869-5878.
- Vauzour, D. (2012). Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2012, 914273.

- Vauzour, D., Vafeiadou, K., Mateos, A., Rendeiro C., and Spencer, J. (2008). The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes and Nutrition*, 3(4), 115-126.
- Vega, J.N. and Newhouse, P.A. (2014). Mild cognitive impairment: diagnosis, longitudinal course, and emerging treatments. *Curr. Psychiatry Rep.*, 16, 490.
- Verbeek, M.M., Otte-Höller, I., Fransen, J.A.M., and de Waal, R.M.W. (2002). Accumulation of the amyloid-beta precursor protein in multivesicular body-like organelles. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, 50, 681–690.
- Verkhratsky, A., and Butt, A.M. (2013). Glial physiology and pathophysiology: a handbook.
- Verstraeten, S., Erlejman, A., Zago, P., and Oteiza, P. (2002). Aluminum affects membrane physical properties in human neuroblastoma (IMR-32) cells both before and after differentiation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 399(2), 167-173.
- Verstraeten, S.V., Keen, C.L., Schmitz, H.H., Fraga, C.G., and Oteiza, P.I. (2003). Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radic. Biol. Med.*, 34, 84–92.
- Viña, J. and Sanz-Ros, J. (2018). Alzheimer's disease: Only prevention makes sense. *Eur. J. Clin. Invest.*, 48, e13005.
- Vincken, J.P., Heng, L., de Groot, A., and Gruppen, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68, 275-297.
- Wahrle, S., Das, P., Nyborg, A., C. McLendon, C., Shoji, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Younkin, S.G., and Golde, T.E. (2002). Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol. Dis.*, 9(1), 11-23.
- Wahrle, S.E., Jiang, H., Parsadanian, M., Hartman, R.E., Bales, K.R., Paul, S.M., and Holtzman, D.M., (2005). Deletion of Abca1 increases Abeta deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.*, 280(52), 43236-43242.

- Walton, J.R. (2012). Aluminum disruption of calcium homeostasis and signal transduction resembles change that occurs in aging and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 29, 255–73.
- Walton, J.R. (2009b). Brain lesions comprised of aluminum rich cells that lack microtubules may be associated with the cognitive deficit of Alzheimer's disease. *Neurotoxicology*, 30, 1059-1069.
- Walton, J.R. (2009c). Functional impairment in aged rats chronically exposed to human range dietary aluminum equivalents. *Neurotoxicology*. 30, 182-193.
- Walton, J.R., and Wang, M.X. (2009a). APP expression, distribution and accumulation are altered by aluminum in a rodent model for Alzheimer's disease. *J. Inorg. Biochem.*, 103, 1548-1554.
- Wang, H.Y., Lee, D.H., D'Andrea, M.R., Peterson, P.A., Shank, R.P., and Reitz, A.B. (2000). beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J. Biol. Chem.* 275, 5626–5632.
- Wang, W., Fu, X.-W., Dai, X.-L., Hua, F., Chu, G.-X., Chu, M.-J., Hu, F.-L., Ling, T.-J., Gao, L.-P., Xie, Z.-W., Wan, X.-C., and Bao, G.-H. (2017). Novel acetylcholinesterase inhibitors from Zijuan tea and biosynthetic pathway of caffeoylated catechin in tea plant. *Food Chem.*, 237, 1172-1178.
- Ward, R.J., Zhang, Y., and Crichton, R.R. (2001). Aluminium toxicity and iron homeostasis. *J. Inorg. Biochem.*, 87, 9–14.
- Webster, S.J., Bachstetter, A.D., Nelson, P.T., Schmitt, F.A., & Van Eldik, L.J. (2014). Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet.*, 5, 88.
- Wei F., Qiu C.S., Liauw J., Robinson D.A., Ho N., Chatila T., Zhuo M., (2002). Calcium calmodulindependent protein kinase IV is required for fear memory. *Nat Neurosci.*, 5, 573-579.
- Wenk, M. R. (2005). The emerging field of lipidomics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 4(7), 594-610.

- Wilhelm, M., Jaeger, D.E., Schull-Cablitz, H., Hafner, D., and Idel, H. (1996). Hepatic clearance and retention of aluminium : studies in the isolated perfused rat liver. *Toxicol. Lett.*, 89, 257-263.
- Wilks, C., Issembé Y. (2000). *Les arbres de la Guinée Equatoriale, région continentale : guide pratique d'identification*: Projet CUREF, Bata, Guinée Equatoriale : 546.
- Williams, R.J., and Spencer, J.P. (2012). Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 52(1), 35-45.
- Willis, H. (2017) Causes, assessment and treatment of malnutrition in older people. *Nurs Older People*, 29, 20-25.
- Winblad, B., Amouyel, P., Andrieu, S., Ballard, C., Brayne, C., Brodaty, H., CedazoMinguez, A., Dubois, B., Edvardsson, D., Feldman, H., Fratiglioni, L., Frisoni, G.B., Gauthier, S., Georges, J., Graff, C., Iqbal, K., Jessen, F., Johansson, G., Jönsson, L., Kivipelto, M., Knapp, M., Mangialasche, F., Melis, R., Nordberg, A., Rikkert, M.O., Qiu, C., Sakmar, T.P., Scheltens, P., Schneider, L.S., Sperling, R., Tjernberg, L.O., Waldemar, G., Wimo, A., and Zetterberg, H. (2016). Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *Lancet Neurol.*, 15, 455-532.
- Wobst, H.J., Sharma, A, Diamond M.I., (2015) The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate prevents the aggregation of tau protein into toxic oligomers at substoichiometric ratios. *FEBS Lett* 589, 77–83.
- Wu, Z, Du., Y., Xue, H. (2012). Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. *Neurobiol. Aging*, 33, 199.e1–12.
- Xie, C.X., and Yokel, R.A. (1996). Aluminum facilitation of iron-mediated lipid peroxidation is dependent on substrate, pH, and aluminium and iron concentrations. *Arch. Biochem. Biophys.*, 327, 222–226.
- Yagi, K. (1976). Simple fluorometric assay for lipoperoxyde in blood plasma. *Biochem. Med.*, 15, 212-216.

- Yang, W., Cui, K., Li, X., Zhao, J. (2021). Effect of Polyphenols on Cognitive Function: Evidence from Population-Based Studies and Clinical Trials. *J. Nutr. Health Aging*, 25(10), 1190-1204.
- Yarlagadda, A., Kaushik, S., and Clayton, A.H. (2007). Blood Brain Barrier: The Role of Calcium Homeostasis. *Psychiatry* (Edgmont (Pa.: Township)), 4 (12), 55- 59.
- Yu, L., Zhang, Y., MaLi, R., Juanzhi, B., Tingxi, F., and Guangdong, Y. (2006). Potent protection of ferulic acid against excitotoxic effects of maternal intragastric administration of monosodium glutamate at a late stage of pregnancy on developing mouse fetal brain. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 16, 170-177.
- Zatta, P., Lain, E., and Cagnolini, C. (2000). Effects of aluminum on activity of krebs cycle enzymes and glutamate dehydrogenase in rat brain homogenate. *Eur. J Biochem.*, 267, 3049-3055.
- Zhang, L., Jin, C., Liu, Q., Lu, X., Wu, S., Yang, J., Du, Y., Zheng, L., and Cai, Y. (2013). Effects of subchronic aluminum exposure on spatial memory, ultrastructure and L-LTP of hippocampus in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 38, 255-68.
- Zhang, X., Wen, J., and Zhang, Z. (2018). Statins use and risk of dementia: A dose-response meta analysis. *Medicine*, 97, e11304.
- Zheng, K., Dai, X, Xiao, N. (2017). Curcumin Ameliorates Memory Decline via Inhibiting BACE1 Expression and β -Amyloid Pathology in 5xFAD Transgenic Mice. *Mol. Neurobiol.*, 54, 1967–1977.
- Zissimopoulos, J. M., Barthold, D., Brinton, R. D., and Joyce, G. (2017). Sex and Race Differences in the Association Between Statin Use and the Incidence of Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.*, 74, 225–232.

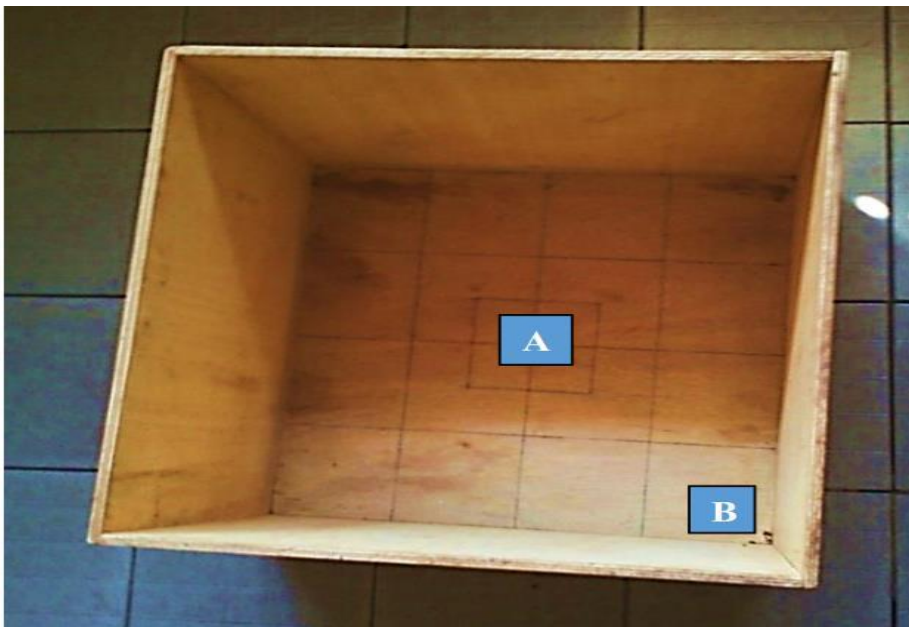
ANNEXES

Annexe 1 : Dispositif HPLC/SM

L'extrait a été injecté sur une colonne Nova-Pak RP-18 (4 μm , 150 \times 3.9 mm i.d.) (Waters). Le gradient utilisé était le suivant : H₂O-MeOH contenant 0.05% de TFA, à un débit de 1 mL.min⁻¹, 75-25 à 0-100 en 25 min, puis 100% de MeOH pendant 5 min. Les spectres de masse ont été enregistrés en mode positif par un spectromètre LCQ (Finnigan MAT) à trappe ionique équipé d'une source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Les analyses ont été effectuées dans les conditions suivantes : gaz réactant : N₂ à un débit de 77 unités, température du vaporisateur : 450 °C ; température du capillaire : 150 °C ; voltage de la source : 6 kV ; courant de la source : 5 μA ; voltage du capillaire : 16 V. Les spectres de masse (150-1000 amu) ont été enregistrés toutes les 2 secondes. Les ions moléculaires protonnés [M+H]⁺ ont été choisis comme ions parents pour la fragmentation.

Annexe 2 : Dispositif *open field* du test de reconnaissance

Il s'agit d'un box aux bords élevés, qui empêche à l'animal se trouvant à l'intérieur de s'échapper ou de se cacher. La surface d'exploration est divisée en 16 carreaux plus 1 carreau central. Le dispositif utilisé dans cette étude est en bois et a pour dimensions : 60 cm de longueur, 60 cm de Largeur et 40 cm de hauteur.



Photographie de l' « Open Field » : carreau central (A) et carreau périphérique (B) (Photo prise par Massop Christelle le 25 Novembre 2018 au Laboratoire de Physiologie Animale de l'Université de Yaoundé I).

Annexe 3 : Dispositif du « Morris Water Maze »

Il s'agit d'un réservoir circulaire noir (diamètre 120 cm × hauteur 50 cm) remplie d'eau à moitié situé dans une pièce éclairée. Une plate-forme d'évacuation de 8 cm de diamètre et de couleur noir (correspondance de couleur avec le dispositif afin de la rendre invisible) est placée en une position fixe (quadrant Sud du dispositif), immergée à 1,0 cm à la surface de l'eau.



Photographie du dispositif de « Morris Water Maze » (Photo prise par Djikem Rudig le 25 Novembre 2018 au Laboratoire de Physiologie Animale de l'Université de Yaoundé I). 1 : plate-forme, N : quadrant Nord, S : quadrant Sud, E : quadrant Est, W : quadrant Ouest.

Annexe 4 : Dispositif du « Wire-Suspension Grip/Agility Test »

Un fil métallique de 120 cm de long et 2 mm de diamètre a été utilisé. Ce fil, maintenu horizontale par deux barreaux à une hauteur de 100 cm du sol, a permis de réaliser le dispositif du test de suspension à la corde ou « Wire-Suspension Grip/Agility Test ». Une bassine contenant de litière de copeau (utilisée pour amortir la chute de l'animal) était placée au niveau du sol (à 80 cm sous la corde).



Photographies du dispositif du « Wire-Suspension Grip/Agility Test » (Photo prise par Zemo Gamo Franklin, 2018). A = plan large et B = plan rapproché.

Annexe 5: Préparation du réactif TBA pour le dosage malondialdéhyde

Pour 100 mL de réactif TBA, 375 mg de TBA; 20 g de TCA; 0,01 g de BHT; 25 mL de HCl (1N) et 50 mL d'eau distillée ont été introduits dans un bécher. La solution obtenue a été chauffée à 40°C dans un bain-marie jusqu'à solubilisation complète du TBA, puis transférée dans une fiole de 100 mL. Le volume a été complété avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Annexe 6: Préparation du réactif d'Ellman

Il est préparé en dissolvant 4,96 mg de DTNB dans 250 mL tampon tris-HCl (0,1 M ; pH 6,5)

Annexe 7: Réactifs dosage de Calcium (kit sigma aldrich)

- Tampon de dosage de calcium (Numéro de catalogue MAK022A)
- Réactif chromogène (Numéro de catalogue MAK022B)
- Étalon de calcium, 500 mM (Numéro de catalogue MAK022C)

Annexe 8: Réactifs dosage magnésium (kit CHRONOLAB)

Réactif 1 (R1):	{	Amino-méthyl-propanol	1
		EGTA (Tampon)	0,21 mmol/L

Réactif 2 (R2):		Calmagite	0,30 mmol/
		Magnésium (Chromogène	0,824 mmol/L

Préparation du réactif de travail

Le réactif de travail est obtenu en mélangeant des volumes égaux de la solution tampon R1 et la solution de chromogène R2.

Annexe 9: Réactif dosage cholestérol (Kit CHRONOLAB)

R1 : Tampon

Tampon PIPES (pH 6,9).....90 mmol/L

Phénol.....26 mmol/L

R2 : Réactif enzyme

Cholestérol estérase.....300 U/L

Cholestérol oxydase.....300 U/L

Peroxydase.....1250 U/L

4-Aminoantipyrine.....0,4 mmol/L

R3 : Solution étalon

Cholestérol standard.....200 mg/dL

R1 + R2 : Solution de travail

La solution de travail est stable pendant quatre mois entre 2 °C à 8 °C ou pendant 40 jours entre 15 à 25 °C.

Annexe 10: Réactifs dosage triglycérides (Kit CHRONOLAB)

R1: Tampon

Tampon GOOD (pH 7,5).....50 mmol/L

p-chlorophénol.....2 mmol/L

R2 : Réactif enzyme

Lipoprotéine lipase (LPL).....150000 U/L

Glycérol kinase (GK).....500 U/L

Glycérol-3-phosphate oxydase (GPO).....2500 U/L

Peroxydase (POD)440 U/L

4-Aminophénazone.....	..0,1 mmol/l
ATP.....	0,1 mmol/l
R3 : Solution étalon	
Triglycérides standard.....	...250 mg/dL
R1 + R2 : Solution de travail	

La solution de travail est stable pendant six semaines entre 2 °C à 8 °C ou pendant 7 jours entre 15 à 25 °C.

Annexe 11: Réactifs dosage glucose (kit Sigma aldrich)

Réactif 1 : Réactif glucose-oxydase / peroxydase (Numéro de catalogue G3660)

Ce réactif est dissout dans dans 39,2 mL d'eau déminéralisée. La solution est stable jusqu'à un mois à 2–8 C et pendant au moins 6 mois à –20 C.

Réactif 2 : Réactif o-Dianisidine (numéro de catalogue D2679)

Le flacon contient 5 mg d'o-dianisidine dichlorhydrate qui est dissout dans 1,0 mL d'eau désionisée. La solution est stable pendant 3 mois à 2–8 C.

Réactif de travail ou test : Ajouter 0,8 mL de réactif o-Dianisidine au flacon ambre contenant les 39,2 mL de réactif de glucose oxydase / peroxydase. La solution est stable jusqu'à 1 mois entre 2 et 8°C

Solution standard de glucose (numéro de catalogue G3285)

Annexe 12: Réactifs pour l'activité des transaminases

Substrats ASAT

- L-aspartate	2,66g
- α-cétoglutarate.....	30 mg

Ces deux réactifs ont été dissouts dans 20 mL de tampon phosphate pH 7,4 (0,1M). Le pH de cette solution a été ajusté à 7,5 avec du NaOH (0,4N) et le volume a été complété à 100 mL avec du tampon phosphate 0,1M. Le substrat obtenu avait une concentration en α-cétoglutarate de 2 mM et en L-aspartate de 200 mM.

Substrats ALAT

- L-alanine.....	1,78 g
- α-cétoglutarate.....	30 mg

Ces deux réactifs ont été dissouts dans 20 mL de tampon phosphate pH 7,4 (0,1M). Le pH de cette solution a été ajusté à 7,5 avec du NaOH (0,4N) et le volume a été complété à 100 mL avec du tampon phosphate 0,1M. Le substrat obtenu avait une concentration en α -cétoglutarate de 2 mM et en L- alanine de 200 mM.

- Tampon phosphate(0,1M; pH 7,4)

Une masse de 13,40 g de phosphate disodique a été dissoute dans 500 mL d'eau distillée. Une masse de 1,36 g de phosphate monosodique a également été dissoute dans 100 mL d'eau distillée. La solution de phosphate disodique a été titrée par la solution de phosphate monosodique jusqu'au pH 7,5. Le volume a été complété à 500 mL avec de l'eau distillée.

- Réactif de coloration : 2,4 dinitrophénylhydrazine (DNPH)

Il a été préparé en dissolvant 0,0198 g de 2,4 dinitrophénylhydrazine dans 100 mL de HCl (1N).

- NaOH..... 0,4 N

Seize (16) g de NaOH ont été dissout dans 1000 mL d'eau distillée.

- Etalon pyruvate..... 2 mM

Vingt-deux milligrammes (22) mg de pyruvate de sodium ont été dissout dans 100 mL de tampon phosphate (0,1 M pH 7,5).

Annexe 13: Réactifs pour le dosage de la créatinine

- Réactif 1: acide picrique8,8 mM
- Réactif 2: NaOH0,4 M
- Etalon créatinine177,80 μ M

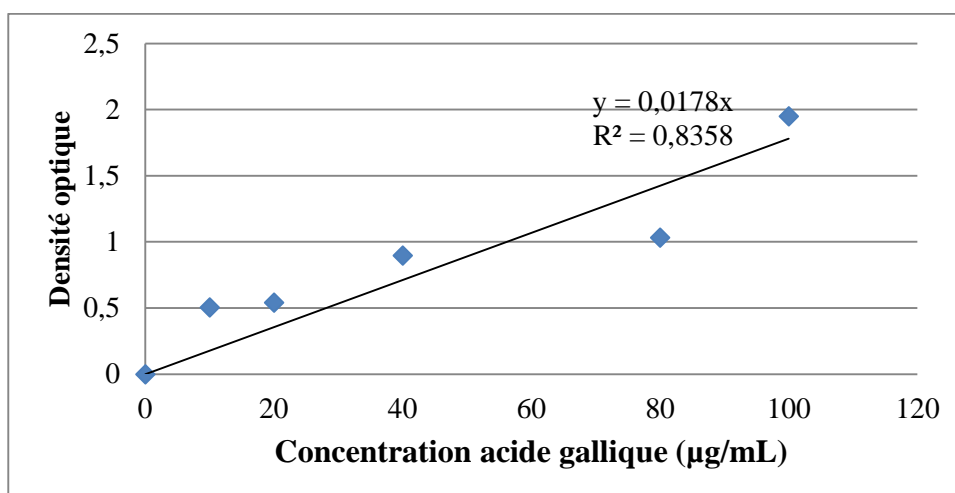
Préparation de la solution de travail

La solution de travail (picrate de sodium) est obtenu en mélangeant des volumes égaux d'acide picrique (8,8 M) et de soude (NaOH 0,4 N).

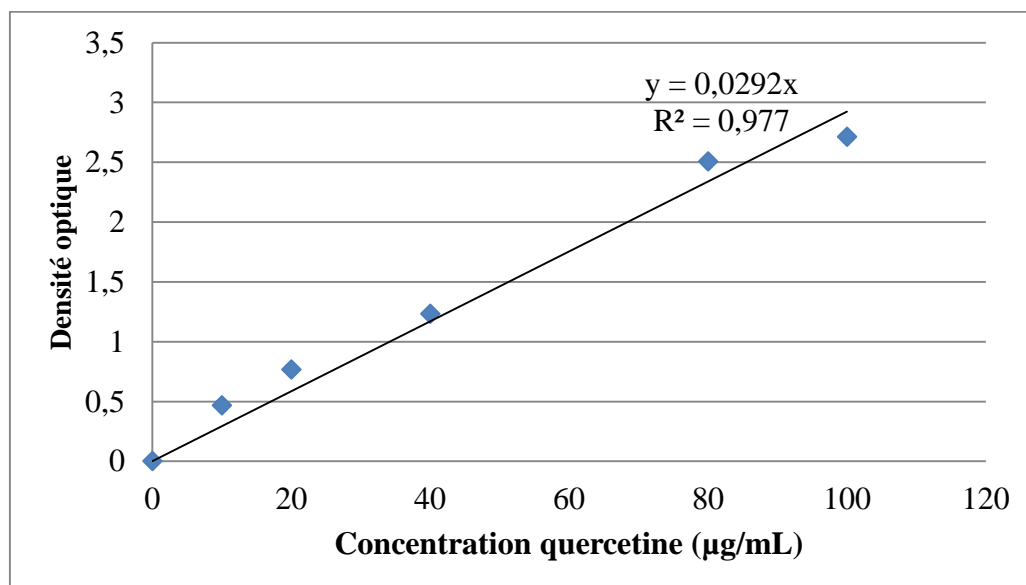
Annexe 14: Réactifs pour le dosage des protéines totales

- Réactif A : 2% p/v de carbonate de sodium (NaCO_3) mélangé avec un volume égal de 0,4 % p/v de NaOH
- - Réactif B : 1% p/v de CuSO_4 mélangé avec un volume égal de 1% p/v de Na, K tartrate
- - Réactif 1 : 1 volume du réactif B mélangé avec 100 volumes du réactif A
- - Réactif 2 : Folin-Ciocalteu 50% v/v

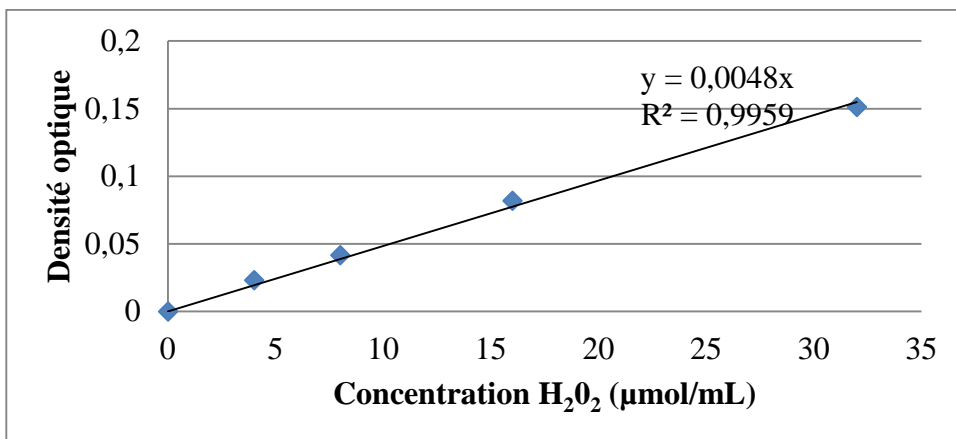
Annexe 15 : Courbe d'étalonnage dosage des polyphénols



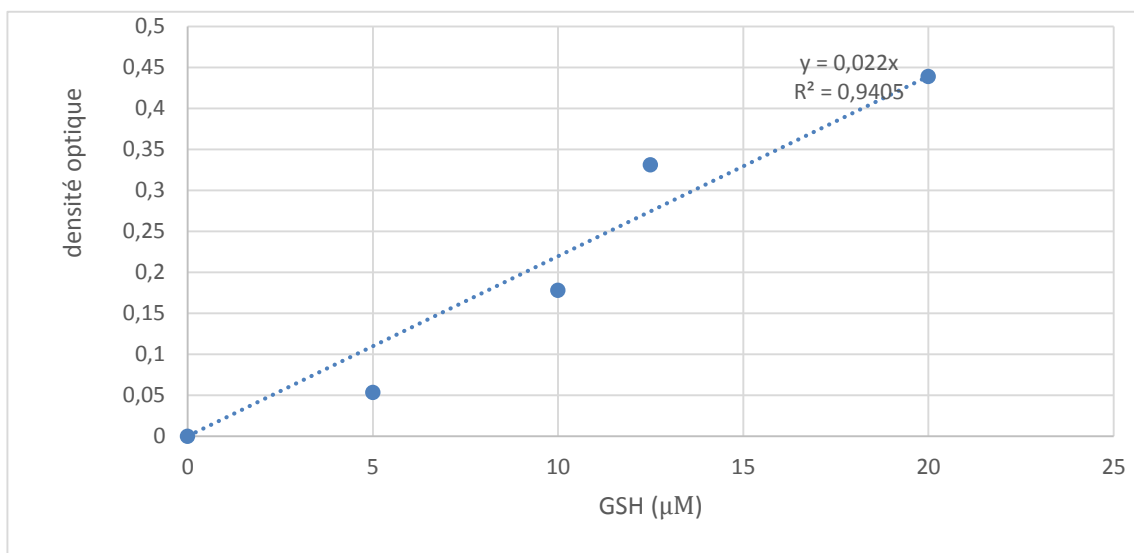
Annexe 16: Courbe d'étalonnage dosage des flavonoïdes



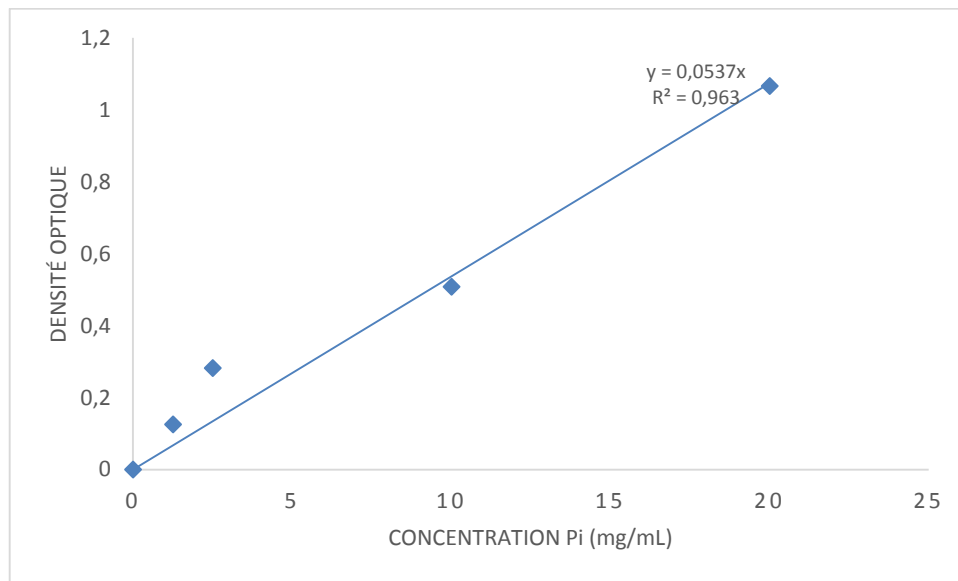
Annexe 17: Courbe d'étalonnage activité de la catalase



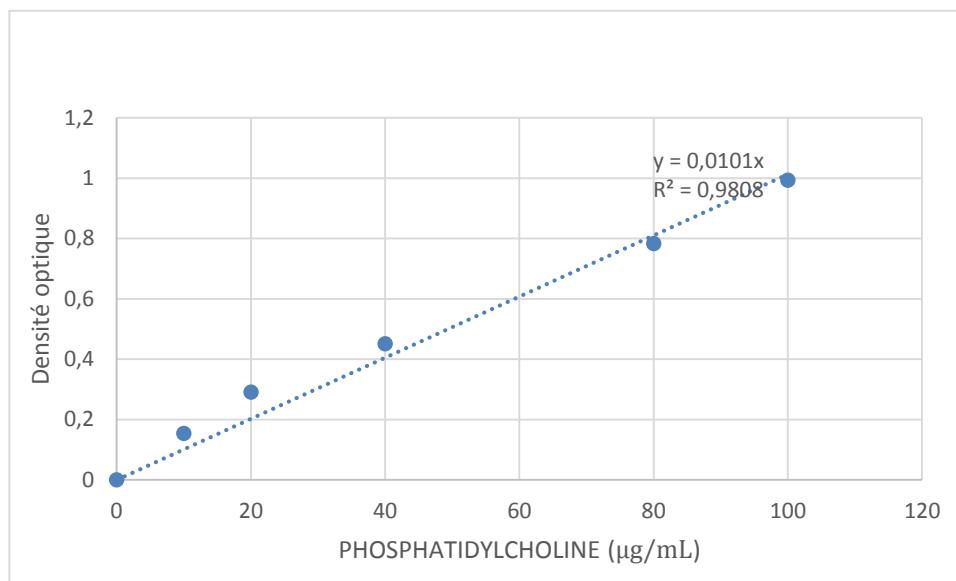
Annexe 18: Courbes d'étalonnage activité de la GPx



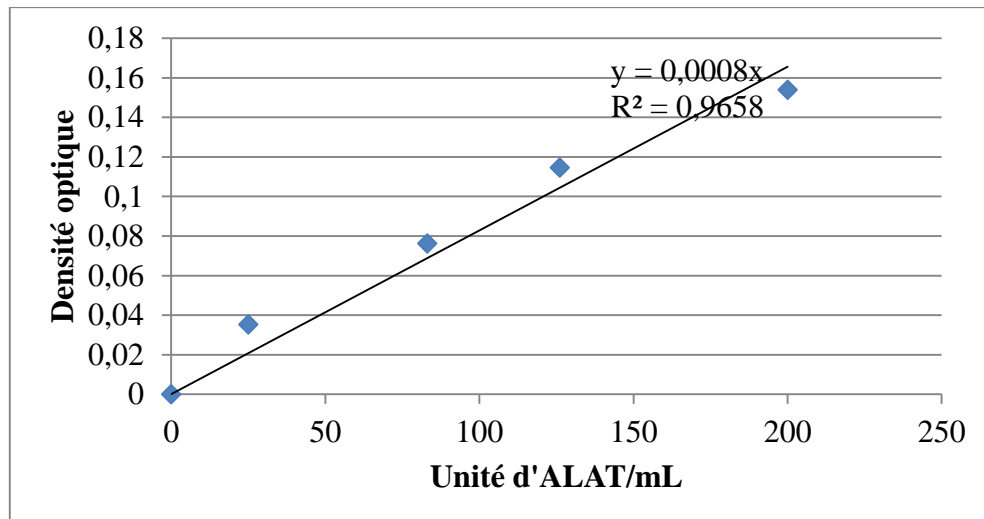
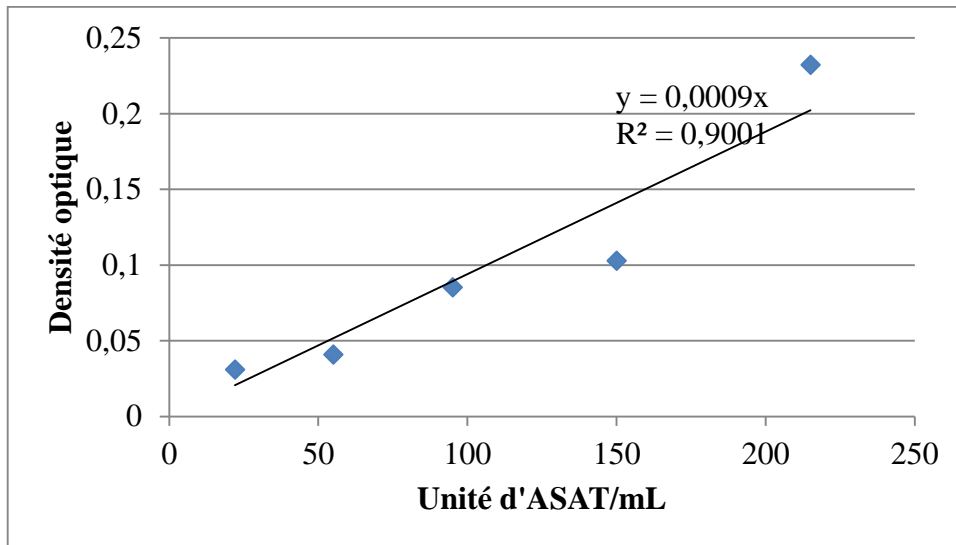
Annexe 19: Courbe d'étalonnage activités des ATPases



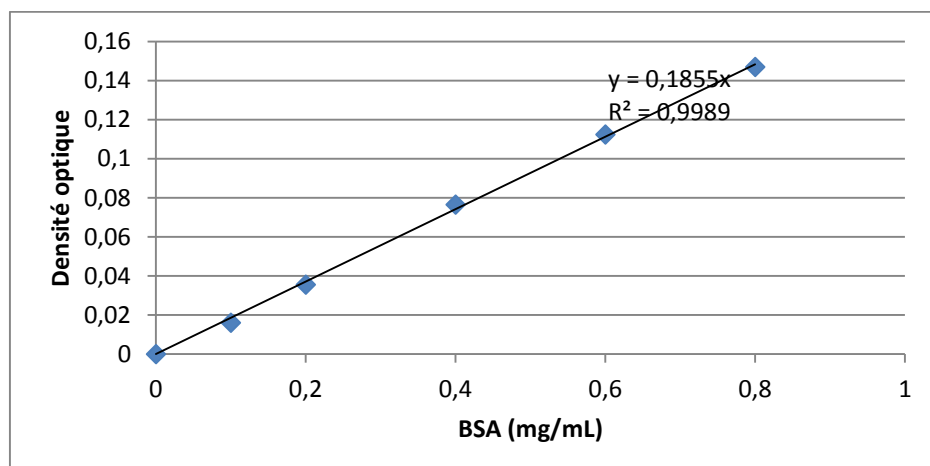
Annexe 20: Courbe d'étalonnage dosage des phospholipides cérébraux



Annexe 21: Courbe d'étalonnage activités des transaminases



Annexe 22 : Courbe d'étalonnage dosages des protéines totales



ARTICLE SCIENTIFIQUE