

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale



N° d'ordre : 01/BA/2020

N° de série: 52/D3C/2020

Thèse de Doctorat

Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3ème cycle

Domaine : Biotechnologie et Biologie de l'Environnement

Option : Physio-Toxicologie Cellulaire

Présentée et soutenue par :

HADJIRA Sabrina

Intitulé :

L'effet protecteur de la plante *Centaurea africana* vis-à-vis la neurotoxicité et l'apoptose induits par la roténone chez le rat

Soutenue le : 19/11/2020

Devant le jury:

Président :	Pr. LALAOUI Korrichi	Université des Frères Mentouri, Constantine 1
Directrice de thèse :	Pr. AMEDDAH Souad	Université des Frères Mentouri, Constantine 1
Examineurs :	Pr. DAHAMNA Saliha	Université Abbas Ferhat Sétif 1
	Pr. KHELIFI TOUHAMI Fatima	Université des Frères Mentouri Constantine 1

Année universitaire 2020/2021

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

D'abord je remercie dieu, le tout puissant qui a illuminé mon chemin et qui m'a armé de courage et de patience pour accomplir ce travail.

*J'adresse en premier lieu mes vifs remerciements à mon Encadreur, professeur **AMEDDAH Souad** pour m'avoir ouvert la porte de son laboratoire de Biologie et Environnement et pour m'avoir guidé pendant mes années de thèse de doctorat. Je la remercie pour ses conseils éclairés, pour sa disponibilité et ses encouragements tout au long de la période de réalisation de cette thèse.*

*Je remercie également le Professeur **MENAD Ahmed** pour ses conseils fréquents et avisés et son aide appréciée dans l'accomplissement de ce travail.*

Recevez, mes professeurs, mon profond respect

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements aux membres du jury pour l'honneur qu'ils m'ont accordé en acceptant de participer à ce jury. Je remercie le Professeur **LALAOUI Korrichi** qui me fait l'honneur de présider ce jury. Mes remerciements également aux Professeurs **DAHAMNA Saliha** et **KHELIFI TOUHAMI Fatima** qui ont accepté d'examiner et de juger mon travail. Cela constitue pour moi à la fois un honneur et une grande joie.*

*Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également au **Dr. CACAN Ercan** et au **Pr. ERENLER Ramazan** pour m'avoir accueilli dans ses laboratoires ; laboratoire de biologie moléculaire et de la génétique et laboratoire de produits naturels, Université Gaziosmanpasa, Tokat, Turquie. Grace à vous, j'ai réalisé des nouvelles expériences par les quelles j'ai renforcé mes résultats. Sachez que vous m'avez aidé bien plus que vous ne le pensez. Je tiens évidemment à remercier aussi l'ensemble du personnel des deux laboratoires, spécialement **Çaglar, Israa, Merve et Ilyas**. Merci pour tous les bons moments que nous avons passé ensemble, pour votre disponibilité et pour avoir contribué à la réussite de mon stage.*

*Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à l'équipe du laboratoire de biologie moléculaire de l'université de bab ezzouar alger pour la réalisation des tests Elisa, ainsi qu'au **Dr. F. BENHADDAD** et à l'ensemble du personnel du service d'anatomie pathologique de l'EPH Houari Boumediene, Chelghoum Laid, wilaya de Mila, pour leur aide dans la réalisation des coupes histologiques.*

*Je tiens aussi à remercier les professeures **SEGHIRI Ramdane**, **BENAYACHE Samir** et **BENAYACHE Fadila** de l'Unité de Recherche et de Valorisation des Ressources Naturelles,*

Molécules Bioactives et analyse Physicochimiques et Biologiques, pour la fourniture des extraits végétaux.

*Mes profonds remerciements à **tous les enseignants** du département de biologie animale qui ont contribué par leur enseignement au bon déroulement de ce mémoire.*

Ce travail a atteint son terme grâce à l'assistance et à la collaboration de nombreuses personnes. Je saisi cette occasion pour remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin.

Enfin, sans le soutien moral et émotionnel de ma famille extraordinaire et leurs encouragements tout au long de ma scolarité, ce travail n'aurait pas pu être achevé. Il m'est impossible d'exprimer en quelques mots combien je leur suis reconnaissante ; je leur adresse mes plus chaleureux remerciements.

Merci à tous

Table des matières

Remerciements	I
المخلص:	XIII
Résumé	XIV
Abstract	XV
Introduction	1
Première Partie : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	4
Chapitre 1 : La maladie de parkinson	5
1.1 Histoire de la maladie de parkinson (MP)	5
1.2 Physiopathologie	6
1.3 Anatomopathologie	7
1.4 Le Système Dopaminergique	7
1.4.1 Biosynthèse de la dopamine	8
1.5 Étiologie	9
1.5.1 Facteurs génétiques	9
1.5.2 Facteurs environnementaux:.....	9
1.5.2.1 Métaux	10
1.5.2.2 Pesticides	10
1.5.3 Combinaison de facteurs	10
Chapitre 2 : Les mécanismes de la neurodégénérescence dans la maladie de Parkinson et l'implication de l'apoptose	13
2.1 Mécanismes de neurodégénération dans la maladie de Parkinson	13
2.1.1 Altérations de la fonction α -synucléine	13
2.1.2 Auto-oxydation de la dopamine	14
2.1.3 Les dépôts de fer.....	16
2.1.4 Dysfonctionnement mitochondrial	17
2.1.5 Stress oxydatif	18
2.1.6 L'excitotoxicité et l'homéostasie du calcium.....	20
2.1.7 La neuroinflammation (l'Activation gliale).....	21
2.1.8 Système Ubiquitin-Proteasome :	22
2.2 Apoptose et Maladie de Parkinson	23
2.2.1 L'apoptose	23
2.2.2 La régulation de l'apoptose	23
2.2.3 Apoptose et Maladie de Parkinson	24
Chapitre 3 : Modèles animaux de la maladie de Parkinson	29
3.1 Modèles animaux de la maladie de Parkinson	29
3.1.1 Modèles animaux neurotoxiques de la MP.....	29

3.1.2 Modèles génétiques de la MP	30
3.2 La Roténone	31
3.2.1 Nature chimique de la molécule	31
3.2.2 Métabolisme et passage de la barrière hématoencéphalique	32
3.2.3 Toxicité.....	33
3.2.4 Mécanisme d'action de la neurotoxicité par la roténone.....	33
3.2.4.1 L'inhibition du complexe I.....	33
3.2.4.2 La roténone et l'apoptose	34
3.2.4.3 La roténone et l'excitotoxicité.....	35
3.2.4.4 La roténone et l'activation microgliale.....	35
3.2.4.5 La roténone et l' α -synucléine	36
3.2.4.6 La roténone et la dopamine	37
3.2.4.7 La roténone et l'accumulation de fer nigral	37
Chapitre 4 : Thérapies de la maladie de parkinson	42
4.1 Traitements médicamenteux	42
4.1.1. Les médicaments dopaminergiques « L-dopa »	42
4.1.2 Agonistes dopaminergiques.....	43
4.1.3 Les inhibiteurs du catabolisme de la dopamine.....	43
4.1.4 Traitement chirurgical	44
Chapitre 5 : Maladie de parkinson et Produits naturels.....	45
5.1 Plantes avec des activités antiparkinsoniennes	45
5.2 Description de la famille des astéracées.....	45
5.3 Description du genre <i>Centaurea</i>	45
5.3.1 Les propriétés biologiques et pharmacologiques des Centaurées.....	46
5.3.2 Données phytochimique du genre <i>Centaurea</i>	46
5.3.2.1 Les composés phénoliques	46
5.3.2.2 Les flavonoïdes.....	47
5.3.3 L'espèce <i>Centaurea africana</i>	48
5.3.4 Travaux antérieurs sur <i>Centaurea africana</i>	49
Deuxième Partie : Partie pratique.....	54
Chapitre 6 : Matériels et méthodes	55
6.1 Matériel végétal et screening phytochimique.....	55
6.1.1 Préparation des extraits	55
6.1.2 Dosage des polyphénols totaux	56
6.1.3 Dosage des flavonoïdes totaux	57
6.1.4 Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS)	57

6.2 Les tests biologiques	58
6.2.1 L'évaluation <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante des deux extraits <i>n</i> -BuOH et AcOEt de <i>C. africana</i>	58
6.2.1.1 Détermination de l'activité antiradicalaire des extraits par le test DPPH°	58
6.2.1.2 Le test du pouvoir réducteur du Fer.....	59
6.2.1.3 Inhibition de la peroxydation lipidique (LPO) induite par le système Fe ²⁺ /acide ascorbique	59
6.2.2 Étude de l'activité anti-inflammatoire des deux extraits <i>n</i> -BuOH et AcOEt de <i>C. africana</i>	60
6.2.2.1 Activité de piégeage de l'oxyde nitrique (NO)	60
6.2.2.2 Induction de l'œdème dans la patte par la carragénine.....	60
6.2.2.2.1 Détermination du volume de l'œdème de la patte	60
6.2.2.2.2 Mesure de l'activité de myéloperoxydase (MPO)	61
6.2.2.2.3 Dosage du malondialdéhyde (MDA).....	61
6.2.3 Étude de l'activité neuroprotective de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>C. africana in vivo</i>	62
6.2.3.1 Induction de la neurotoxicité et traitement des rats	62
6.2.3.2.1 Score comportemental du mouvement général.....	63
6.2.3.2.2 Le test de la Catalepsie	63
6.2.3.3 Estimation des marqueurs neurochimiques	63
6.2.3.3.1 Estimation de la teneur en dopamine.....	63
6.2.3.3.2 Détermination de la teneur en L-glutamate	64
6.2.3.4 Évaluation des marqueurs du stress oxydant au niveau du cytosol	64
6.2.3.4.1 Préparation de la fraction cytosolique	64
6.2.3.4.2 Dosage de malondialdéhyde (MDA)	64
6.2.3.4.3 Mesure de l'activité cérébrale de la paraoxonase 1 (PON1)	64
6.2.3.4.4 Dosage de glutathion (GSH).....	65
6.2.3.4.5 Dosage de la glutathion peroxydase (GPx) cytosolique	65
6.2.3.4.6 Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST)	65
6.2.3.4.7 Dosage de la glutathion réductase (GR) cytosolique.....	66
6.2.3.5 Évaluation des marqueurs du stress oxydant au niveau des mitochondries	67
6.2.3.5.1 Préparation de la fraction mitochondriale.....	67
6.2.3.5.2 Dosage de l'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD)	67
6.2.3.6 Dosage des protéines totales.....	68
6.2.3.7 Évaluation du dysfonctionnement mitochondrial / Activité du Complexe I (NADH-coenzyme Q oxydoréductase).....	68
6.2.3.8 Mesure des marqueurs apoptotiques.....	68
6.2.3.9 Mesure des marqueurs neuroinflammatoires.....	68
6.2.3.9.1 Détermination du facteur de nécrose tumorale-alpha	68
6.2.3.9.2 Détermination de l'oxyde nitrique (NO).....	68

6.2.3.9.3 Mesure de l'activité de la Myéloperoxydase (MPO).....	68
6.2.3.10 Étude histologique	69
Chapitre 7 : Résultats	72
7.1 Screening phytochimique	72
7.1.1 Dosage des polyphenols et des flavonoïdes.....	72
7.1.2 Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS)	72
7.2. Évaluation de l'activité antioxydante des deux extraits AcOEt et <i>n</i>-BuOH de <i>C. africana</i>	75
7.2.1 L'effet scavenger du DPPH°	75
7.2.2 Le pouvoir réducteur	76
7.2.3 Inhibition de la peroxydation lipidique (LPO) induite par le système Fe ²⁺ /acide ascorbique	76
7.3 Évaluation de l'activité anti-inflammatoire des deux extraits AcOEt et <i>n</i>-BuOH de <i>C. africana</i>	77
7.3.1 Test de l'activité de piégeage de l'oxyde nitrique (NO) <i>in vitro</i>	77
7.3.2 Modèle d'inflammation aiguë : Œdème induit par la carragénine <i>in vivo</i>	78
7.3.2.1 Détermination du volume de l'œdème de la patte induit par la carragénine	78
7.3.2.2 Activité de la myéloperoxydase (MPO) et taux de malondialdéhyde (MDA) dans les tissus des pattes.....	79
7.4 Évaluation de l'activité neuroprotective de l'extrait <i>n</i>-BuOH de <i>C. africana in vivo</i>	80
7.4.1 Testes comportementaux	80
7.4.1.1 Effet de l'extrait <i>n</i> -BuOH sur la catalepsie induite par la Roténone	80
7.4.1.2 Analyse générale des mouvements	81
7.4.2 Effet de l'extrait <i>n</i>-BuOH de <i>C. africana</i> sur les marqueurs neurochimiques	82
7.4.3 Évaluation du statut oxydant cytosolique	83
7.4.3.1 La peroxydation lipidique et l'activité de la paraoxonase 1 cérébrale (PON1).....	83
7.4.3.2 Activité enzymatique du système glutathion cytosolique	84
7.4.3.3 Évaluation du statut oxydatif mitochondrial.....	84
7.4.4 Évaluation du dysfonctionnement mitochondrial	86
7.4.5 Évaluation des marqueurs apoptotiques	86
7.4.6 Évaluation des marqueurs neuroinflammatoires	87
7.4.7 Analyse histopathologique	89
Chapitre 8 : Discussion	92
Conclusion et perspectives :	i

Liste des abréviations :

AcOEt	Acétate d'éthyle
ADH	Alcool déshydrogénase
ADNmt	Acide désoxyribonucléique mitochondriale
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
AIF	facteur induisant l'apoptose
Apaf-1	facteur d'activation de la protéase apoptotique
ATP	Adénosine triphosphate
α-Syn	α -synucléine
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BECA	L'extrait <i>n</i> -BuOH de la plante <i>C. africana</i>
C I	complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale
CAT	Catalase
CDNB	1-chloro-2,4dinitrobenzene
CoQ	Coenzyme Q
COMT	Catéchol-O méthyl transférase
COX	Cyclo-oxygénase
Cyt C	Cytochrome C
DA	Dopamine
DAergique	Dopaminergique
DAT	Transporteur membranaire de la dopamine
DOPAC	l'acide dihydroxyphénylacétique
DOPAL	Dopamine 3,4-dihydroxyphényl-acétaldéhyde
DDC	DOPA décarboxylase
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DPPH^o	2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle
DTNB	Acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque
EAECA	L'extrait AcOEt de la plante <i>C. africana</i>
EGTA	Ethylene glycol tetra acetic acid
ERA	Espèce Réactive de l'azote
ERO	Espèce Réactive de l'Oxygène
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit

GPx	Glutathion peroxydase
GSSG	Glutathion disulfure
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HVA	Acide homovanillique
I %	Pourcentage d'inhibition
IC₅₀ %	Concentration inhibitrice de 50 %
IAP	inhibiteur de l'apoptose
IDDP	inhibiteurs de la dopa décarboxylase périphérique
IFN-γ	Interféron - γ
IL	Interleukine
IL-1β	Interleukine 1 β
iNOS	Oxyde nitrique synthétase inductible
LC-MS	Liquid chromatography-Mass spectrum
L-DOPA	(L)-3,4 dihydroxyphénylalanine
LPO	peroxydation lipidique
MAO	Monoamine oxydase
MDA	Malonyldialdéhyde
Mn-SOD	Superoxyde dismutase mitochondrial
MP	Maladie de parkinson
MPO	Myéloperoxydase
NAD⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADP⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
<i>n</i>-BuOH	<i>n</i> -butanol
NF-κB	Nuclear factor-kappaB
NMDA	Récepteurs N-Methyl-D-aspartate
NO	Oxyde nitrique (monoxyde d'azote)
NOS	NO synthase
O₂⁻	Radical anion superoxyde
HO[·]	Radical anion hydroxyde
ONOO⁻	Peroxynitrite
PcP	Personne cum Parkinson
PON1	Paraoxonase 1
PTPm	Pores de transition de la perméabilité mitochondriale

PMME	Perméabilisation de la membrane externe mitochondriale
PBS	Phosphate Buffer Solution
RE	Réticulum endoplasmique
RL	Radicaux Libre
ROT	Roténone
SD	Standard deviation
SEM	Standard error of the mean
SNC	Système nerveux central
SN	Substance noire
SNpc	Substance noire pars compacta
SNpr	Substance noire pars reticulata
SOD	Superoxyde dismutase
STN	Noyau sous-thalamique
ST	Striatum
SUP	Système ubiquitine-protéasome
TBA	Thiobarbituric acid
TBARS	Thiobarbituric acid-reactive substances
TCA	Acide trichloroacétique
TH	Tyrosine Hydroxylase
TNF- α	Tumor necrosis factor
VMAT2	Transporteur vésiculaire monoamine 2
4-HNE	4-hydroxynonéal

Liste des Figures

Figure 1.1: Coupe de cerveau montrant la localisation de la substance noire.	6
Figure 1.2: Corps de Lewy.....	7
Figure 1.3. Une perte des neurones DAergiques qui se projettent de la SNpc jusqu'au ST dans la MP	7
Figure 1.4 : La dépigmentation de la SNpc	8
Figure 1.5: Synapse DAergique et métabolisme de la DA	10
Figure 2.1: Mécanismes moléculaires clés contribuant au processus neurodégénératif des neurones DAergiques de la SNpc dans la MP.....	14
Figure 2.2: Le processus de repliement de l' α -Syn	15
Figure 2.3: Diagramme conceptuel sur les sources et le devenir métabolique du DOPAL dans les neurones dopaminergiques.....	16
Figure 2.4: Fer, DA et α -Syn dans les neurones DAergiques.....	17
Figure 2.5: Dysfonctionnement mitochondrial dans la MP	19
Figure 2.6: Mécanismes cellulaires possibles attribués au stress oxydatif dans la MP	20
Figure 2.7: Les systèmes antioxydants aident à neutraliser les ERO du corps.....	21
Figure 2.8 : Excitotoxicité et élévation des taux de calcium induisent la mort cellulaire	22
Figure 2.9: Un cercle vicieux neuroinflammatoire qui peut avoir lieu dans la MP.....	23
Figure 2.10: Transduction du signal de la mort cellulaire apoptotique	26
Figure 3.1: Représentation schématique d'un neurone DAergique de la SNpc montrant les cibles moléculaires des divers agents utilisés pour induire des modèles animaux de la MP qui présentent une dégénérescence des voies nigro-striatales	31
Figure 3.2 : Modèles transgéniques de la MP chez la souris	32
Figure 3.3 : Structure de la roténone.....	33
Figure 3.4: Production de superoxyde induite par la ROT et provocation d'un cycle d'auto- propagation du stress oxydatif.	35
Figure 3.5: Mécanisme d'action de la roténone.....	37
Figure 3.6: Mécanisme d'accumulation intracellulaire de la DOPAL induite par la roténone	38
Figure 4.1 : Cibles médicamenteuses DAergiques dans la MP	43
Figure 5.1: Classification des polyphénols	48
Figure 5.2: Feuilles et Fleures de l'espèce <i>C. africana</i>	50
Figure 6.1 : Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de <i>C. africana</i>	57
Figure 6.2. Structure chimique du radical libre DPPH°	59
Figure 6.3: Réaction d'Ellman.....	66
Figure 6.4 : Réaction de Conjugaison CDNB-GSH par la GST	67

Figure 6.5: Réaction de réduction du GSSG en GSH par le NADPH en présence de GR	67
Figure 7.1 : Chromatogrammes d'étalons de l'analyse LC-MS/MS.....	74
Figure 7.2 : Le profile LC-MS/MS de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>C. africana</i>	75
Figure 7.3 : L'activité antioxydante des deux extraits de <i>C. africana</i> : AcOEt et <i>n</i> -BuOH vis-à-vis le radical DPPH°.....	76
Figure 7.4 : Pouvoir réducteur des extraits (<i>n</i> -BuOH et EtOAc) de <i>C. africana</i>	77
Figure 7.5: Le pouvoir antiperoxydative des extraits <i>n</i> -BuOH et EtOAc de <i>C. africana</i>	78
Figure 7.6: L'effet scavenger des extraits <i>n</i> -BuOH et EtOAc de <i>C. africana</i> contre le radical (NO).	79
Figure 7.7: Effet anti-inflammatoire des extraits <i>n</i> -BuOH et EtOAc de <i>C. africana</i> sur l'oedème de la patte du rat induit par la carragénine.....	80
Figure 7.8 : Effet anti-inflammatoire des extraits <i>n</i> -BuOH et EtOAc de <i>C. africana</i> sur la production du MDA et l'activité de la MPO dans les tissus des pattes des rats.	81
Figure 7.9 : L'effet de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>C. africana</i> (200 mg / kg) sur le temps de latence (test de catalepsie) durant 21 jours.	82
Figure 7.10 : L'effet de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>C. africana</i> (200 mg / kg) sur les mouvements du rat (score de l'échelle de Ludolph).	82
Figure 7.11 : L'effet de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>C. africana</i> (200 mg / Kg) sur les niveaux de marqueurs neurochimiques, (a, glutamate) (b, dopamine) dans les cerveaux des rats traités par la ROT (1 mg/kg).....	83
Figure 7.12 : Influence de l'administration de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>C. africana</i> (200 mg/kg) sur le taux de MDA et PON1 dans les cerveaux des rats traités par la ROT (1 mg/kg).....	84
Figure 7.13 : L'Effet de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>C. africana</i> (200 mg/kg) sur le système glutathion cytosolique dans les cerveaux des rats traités par la ROT (1 mg/kg)..	85
Figure 7.14 : L'effet de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>C. africana</i> (200 mg/kg) sur la variation des taux de la MDA et du GSH, et sur les enzymes antioxydantes mitochondriales des cellules de cerveau des rats traités par la ROT (1 mg/kg).	86-87
Figure 7.15 : L'effet de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>C. africana</i> (200 mg/kg) sur l'activité du complexe I dans les cellules de cerveau des rats traités par la ROT (1 mg/kg).....	88
Figure 7.16 : L'effet de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>C. africana</i> (200 mg/kg) sur les marqueurs Bax, caspase-3 et Bcl-2 dans les cellules de cerveau des rats traités par la ROT (1 mg/kg).	88-89
Figure 7.17 : L'effet de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>C. africana</i> (200 mg/kg) sur la variation des taux des médiateurs pro-inflammatoires (TNF- α , NO et MPO) dans les cerveaux des rats traités par la ROT (1 mg/kg).....	89-90
Figure 7.18 : Micrographe de l'étude histopathologique	90-91-92

Liste des tableaux

Tableau 7.1 : Teneur en polyphénols et flavonoïdes des extraits (<i>n</i> -BuOH et EtOAc) de <i>C. africana</i>	73
Tableau 7.2 : Le profile LC-MS/MS de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>C. africana</i>	75

الملخص:

يمثل داء باركنسون أحد الأمراض العصبية المزمنة ذات التطور التدريجي. تهدف هذه الدراسة إلى استكشاف التأثير البيولوجي للنبته الأصلية *Centaurea africana* في الحد من آثار هذا الداء تجريبيا باستحداثه لدى جردان من سلالة (Wistar Albinos) بواسطة مادة الـ Roténone. بداية انطلقت هذه الدراسة بالاختبارات *in vitro* حيث أظهر الطور EtOAc فعالية معتبرة للفعل المضاد للأكسدة (DPPH° ، الفعل الاختزالي ، الفعل التثبيطي للأكسدة الليدية)، أما الطور *n*-BuOH لهذه النبتة فقد أبدى استجابة معتبرة للفعل التثبيطي للالتهابات (اختبارات قنص NO واختبارات النشاط المضاد للالتهابات الناجمة عن carragénine) حيث أظهرت النتائج تأثير كبير ضد التورمات القدمية وخفض مستويات MPO و MDA بالانسجة القدمية الملتهبة.

كما أكد التقصي *in vivo* في هذه الدراسة تغيرات سلوكية لدى الجردان يسببها الـ Rotenone عند الجرعة (1 mg/kg) عن طريق الحقن تحت الصفاق، حيث أدى إلى ظهور تسمم على مستوى نسيج الدماغ ويظهر ذلك من خلال الفحوص الدقيقة المجهرية، كما أدى إلى نشاط مؤشرات الالتهاب العصبي. يتم التعبير عن الخل الوظيفي في الميتوكوندريا الناجم عن Rotenone من خلال الانخفاض في نشاط المعقد I للسلسلة التنفسية للميتوكوندريا وبتغيير في مستوى مؤشرات التوتر التأكسدي في الدماغ حيث لوحظ ارتفاع في مستوى MDA وانخفاض في نشاط مضادات الأكسدة (GSH, GPx, GR, GST)، والتي بدورها تنشط مسار الموت المبرمج للخلايا. أثبتت النتائج المتحصل عليها أنّ المستخلص البيتانولي (*n*-BuOH) عند الجرعة (200 mg/kg) أبدى فعلا تعديليا للمؤشرات العصبية (Dopamine, Glutamate) المختلة لدى الجردان بفعل الـ Rotenone وكذا تعديل المؤشرات المضادة للأكسدة PON1 و MDA والنظام الجلوتاثيوني، و النظام المضاد للأكسدة الميتوكوندري و تعديل نشاط المعقد I. أبدى هذا المستخلص أيضا أثرا فعالا في الاقلال من الالتهاب بخفض مستويات TNF- α ، NO و MPO واختزال التغيرات النسيجية المستحدثة بالنسيج الدماغي. تمكن هذا المستخلص أيضا من تعديل مؤشرات الموت المبرمج للخلايا (Bcl-2, Bax, caspase 3) المصاحبة لهذا الداء المستحدث لدى الجردان. يبدو أنّ غنى *Centaurea africana* بعديدات الفينول وفقا للكروماتوغرام LC-MS/MS يكون ذا أثر تآزري في ابداء هذا الدور البيولوجي ضد داء باركنسون.

الكلمات المفتاحية:

Roténone, Centaurea africana ، جردان، التوتر التأكسدي، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للالتهابات ، عديدات الفينول، LC-MS/MS

Résumé

La maladie de parkinson (MP) est une atteinte neurodégénérative chronique qui se développe d'une manière lentement progressive et sans cause identifiable. Le but de cette investigation est l'étude du potentiel biologique des fractions *n*-BuOH et EtOAc de la plante *Centaurea africana* ainsi que l'exploration de l'effet modulateur de l'extrait *n*-BuOH chez les rats (*Wistar* Albinos) traités par la roténone. Les études *in vitro* (DPPH°, pouvoir réducteur du fer, inhibition de la LPO) ont montré que *C. africana* est dotée de propriétés antioxydantes. Les études anti-inflammatoires ont prouvé que l'extrait *n*-BuOH possède cet effet qui se traduit par l'inhibition de l'œdème des pattes induit par la carragénine chez le rat et la diminution de l'activité de la MPO et des taux du MDA au niveau des tissus des pattes. Les études réalisées *in vivo* ont été focalisées sur l'effet modulateur de l'extrait *n*-BuOH de *C. africana* (200 mg/kg) vis-à-vis les altérations biochimiques, neurochimiques, histopathologiques et comportementales induites par la roténone (1 mg/kg; ip) chez les rats. La roténone provoque des déficits comportementaux et moteurs et aussi active la neuroinflammation. Le dysfonctionnement mitochondrial induit par la roténone est exprimé par la diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et par l'altération du statut oxydant/antioxydant du cerveau, ce qui active la voie apoptotique intrinsèque. Cette étude a révélé que l'action de l'extrait *n*-BuOH se procède par plusieurs mécanismes: neutralisation du stress oxydant, modulation des marqueurs de l'apoptose (Bcl-2, Bax et caspase 3), des marqueurs neurochimiques (dopamine et glutamate), et réduction de la neuroinflammation qui est traduite par la diminution de l'activité de la MPO et des taux du NO et du TNF- α . Les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires de cette plante s'expliquent probablement par sa richesse en polyphénols et flavonoïdes, révélées par le screening phytochimique et l'analyse LC-MS/MS, et/ou par les interactions synergiques des composés phénoliques isolés.

Mots clés: *Roténone, Centaurea africana, Rats, Stress oxydatif, Activité antioxydante, Activité anti-inflammatoire, Composés phénoliques, LC-MS/MS.*

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a chronic neurodegenerative disorder that develops in a slowly progressive manner with no identifiable cause. The aim of this investigation is the study of the biological potential of the *n*-BuOH and EtOAc fractions extracted from the plant *Centaurea africana* and elucidate the modulatory effect of the *n*-BuOH extract in rats (*Wistar Albinos*) treated with rotenone. *In vitro* studies (DPPH°, reducing power of iron, inhibition of LPO) have shown that *C. africana* is endowed with antioxidant properties. Anti-inflammatory studies have shown that *n*-BuOH extract has this effect which is resulting in the inhibition of paw edema induced by carrageenan in rats and decreased activity of MPO and MDA levels in paw tissues. *In vivo* studies have investigated the modulatory effect of *n*-BuOH extract of *C. africana* (200 mg/kg) against biochemical, neurochemical, histopathological and behavioural alterations induced by rotenone (1 mg/kg; ip) in rats. Rotenone causes behavioral and motor deficits and also activates neuroinflammation. The mitochondrial dysfunction induced by ROT is expressed by the decrease in the activity of complex I of the mitochondrial respiratory chain and by the alteration of the oxidant/antioxidant status of the brain, which activates the intrinsic apoptotic pathway. This study revealed that the *n*-BuOH extract acts by several mechanisms: neutralization of oxidative stress, modulation of markers of apoptosis (Bcl-2, Bax and caspase 3) and neurochemical markers (dopamine and glutamate), and reduction of neuroinflammation which results in decreased MPO activity and lower levels of NO and TNF. The antioxidant and anti-inflammatory properties of this plant are probably explained by its richness in polyphenols and flavonoids, which have been revealed by phytochemical screening and LC-MS/MS analysis, and/or by the synergistic interactions of the isolated phenolics.

Keywords: Rotenone, *Centaurea africana*, Rats, Oxidative stress, Antioxidant activity, Anti-inflammatory activity, Phenolic compounds, LC-MS/MS.

Introduction

La maladie de parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative chronique à progression lente sans cause identifiable [1]. Couramment, elle représente l'une des troubles neurodégénératives liée à l'âge après celles de la maladie d'Alzheimer [2]. La MP s'exprime par un ensemble de troubles moteurs (akinésie, rigidité, tremblement au repos et troubles posturaux) et de troubles non-moteurs [1]. La principale manifestation pathologique de la MP est la perte sélective relative de neurones dopaminergiques dans la substance noire [3]. Différents mécanismes sont associés à la neuropathogénèse des cellules dopaminergiques, les particuliers sont le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, le stress oxydatif, l'apoptose et les processus neuro-inflammatoires [3, 4].

La ROT est un pesticide naturel obtenu à partir des racines de certaines espèces végétales [5]. La majorité des études portant sur la ROT ont mis l'accent sur la capacité de cette toxine à induire des effets neuropathologiques rappelant ceux observés dans la MP ; perte de terminaisons dopaminergiques dans le ST et formation d'inclusions appelées corps de Lewy dans la substance noire [6]. Chez le rat, la ROT provoque l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (C I), le stress oxydatif activant la voie intrinsèque apoptotique et la formation d'inclusions cytoplasmiques fibrillaires contenant de l'ubiquitine et de l' α -Synucléine. En outre, des études ont montré que l'exposition à la ROT induit des déficits comportementaux et moteurs, similaires à ceux observés dans la MP humaine [7]. Il a été signalé que le modèle de la ROT est hautement reproductible et peut fournir un excellent outil pour tester de nouvelles stratégies neuroprotectrices [8].

Ces dernières années, un intérêt croissant a été porté au traitement et à la prévention de la MP par des médicaments à base de plantes [9]. Les flavonoïdes qui sont l'un des constituants de ces plantes médicinales sont des substances naturelles qui acquièrent diverses propriétés pharmacologiques et des applications thérapeutiques. Des études récentes suggèrent que les flavonoïdes préviennent et retardent la neurodégénérescence, chez les personnes âgées, dans les dysfonctions cognitives, dans le déclin de l'humeur et dans les pathologies oxydatives. Les antioxydants sont maintenant utilisés comme médicaments candidats pour le traitement des pathologies liées à l'oxydation des radicaux libres [10]. Des études antérieures, sur la MP, ont tenté de trouver un agent neuroprotecteur capable de protéger les neurones.

Notre investigation vise, via la conception d'un modèle de MP induit par la ROT chez le rat albinos *Wistar*, à étudier l'effet protecteur de *C. africana* vis-à-vis le stress oxydatif et la neuroinflammation ainsi que les modifications histopathologiques, neurochimiques et comportementales y associées. Cette plante, utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement

des inflammations, est une espèce endémique à l'Algérie. Les études dont l'objet est la clarification du rôle protecteur de cette espèce endémique vis-à-vis la MP sont tellement minimes.

La méthodologie adoptée durant ce travail a compris les étapes suivantes :

- Screening phytochimique : analyse qualitative et quantitative en utilisant l'analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), afin de déterminer le profil chimique de la plante *C. africana*.
- Valorisation du potentiel biologique antioxydant et anti-inflammatoire de *C. africana*.
- Evaluation de l'effet protecteur de l'extrait *n*-buthanolique de *C. africana* contre le stress oxydatif, la neuroinflammation, le dysfonctionnement mitochondrial et l'apoptose induits par la ROT, ainsi que l'étude des modifications histopathologiques, neurochimiques et comportementales associées à ce modèle expérimental *in vivo* de la MP.
- Traitements statistiques : effectués par l'analyse de variance (ANOVA à un facteur) suivie par le test HSD de Tukey pour la comparaison des moyennes en utilisant le logiciel Open stat 2014 programme et le software Graph Pad Prism, version 3 pour windows, et Graph Pad Software (San Diego, CA, USA).

Références bibliographiques

- [1] Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci.* 2015; 9:124.
- [2] Zeng XS, Geng WS, Jia JJ, Chen L, Zhang PP. Cellular and Molecular Basis of Neurodegeneration in Parkinson Disease. *Front Aging Neurosci.* 2018; 10:109. doi: 10.3389/fnagi.2018.00109
- [3] Broski SM, Hunt CH, Johnson GB, Morreale RF, Lowe VJ, Peller PJ. Structural and Functional Imaging in Parkinsonian Syndromes. *RadioGraphics.* 2014; 34(5):1273-1292. doi:10.1148/rg.345140009
- [4] Ho PW, Ho JW, Liu HF, Zhang WY, Chu AC, Kwok KH, Ge X, Chan KH, Ramsden DB, Ho SL. Mitochondrial neuronal uncoupling proteins: a target for potential disease-modification in Parkinson's disease. *Transl Neurodegener.* 2012; 1(1):3.
- [5] Duke SO, Cantrell CL, Meepagala KM, Wedge DE, Tabanca N, Schrader KK. Natural toxins for use in pest management. *Toxins (Basel).* 2010; 2(8):1943-62.
- [6] Fleming SM, Zhu C, Fernagut PO, Mehta A, DiCarlo CD, Seaman RL, Chesselet MF. Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. *Exp Neurol.* 2004; 187(2):418-29.

- [7] Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem*. 2003; 278(10):8516-25.
- [8] Zaitone SA, Abo-Elmatty DM, Shaalan AA. Acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid affect rotenone-induced damage in nigral dopaminergic neurons of rat brain, implication for Parkinson's disease therapy. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012; 100(3):347-60.
- [9] Rabiei Z, Solati K, Amini-Khoei H. Phytotherapy in treatment of Parkinson's disease: a review. *Pharm Biol*. 2019; 57(1):355–362.
- [10] Anusha C, Sumathi T, Joseph LD. Protective role of apigenin on rotenone induced rat model of Parkinson's disease: suppression of neuroinflammation and oxidative stress mediated apoptosis. *Chem Biol Interact*. 2017; 269:67–79.

Première Partie :
SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : La maladie de parkinson

1.1 Histoire de la maladie de parkinson (MP)

La MP a été décrite pour la première fois en 1817 par le médecin anglais James Parkinson (1755-1824) dans sa publication classique "An essay on the shaking palsy" (Essai sur la paralysie tremblante) [1]. Dans son travail, Parkinson a décrit les signes moteurs qui définissent ce trouble : Mouvement tremblant involontaire avec un pouvoir musculaire réduit dans des parties qui ne sont pas en action [2]. Le neurologue français Jean-Martin Charcot a parlé de la MP comme un trouble caractérisé par un tremblement au repos, une rigidité, une immobilité faciale caractéristique, et des troubles particuliers de la démarche et de la posture [3]. Le neuropathologiste russe Konstantin Tretiakoff a reporté en 1919, une dégénérescence dans la substance noire, devenant ainsi le premier à relier cette région cérébrale à la maladie (figure 1.1). Il a également confirmé la présence d'inclusions cytoplasmiques décrites à l'origine par Lewy en 1914. Ces inclusions sont maintenant largement reconnues comme la caractéristique pathologique de la MP et sont appelées corps de Lewy (figure 1.2) [4, 5]. Des progrès importants ont été accomplis dans différents domaines, du phénotype clinique au décodage de certaines caractéristiques neuropathologiques potentielles, parmi lesquels les domaines de la génétique et de la découverte de médicaments ont rapidement évolué pour devenir la base de la recherche sur la maladie [5].

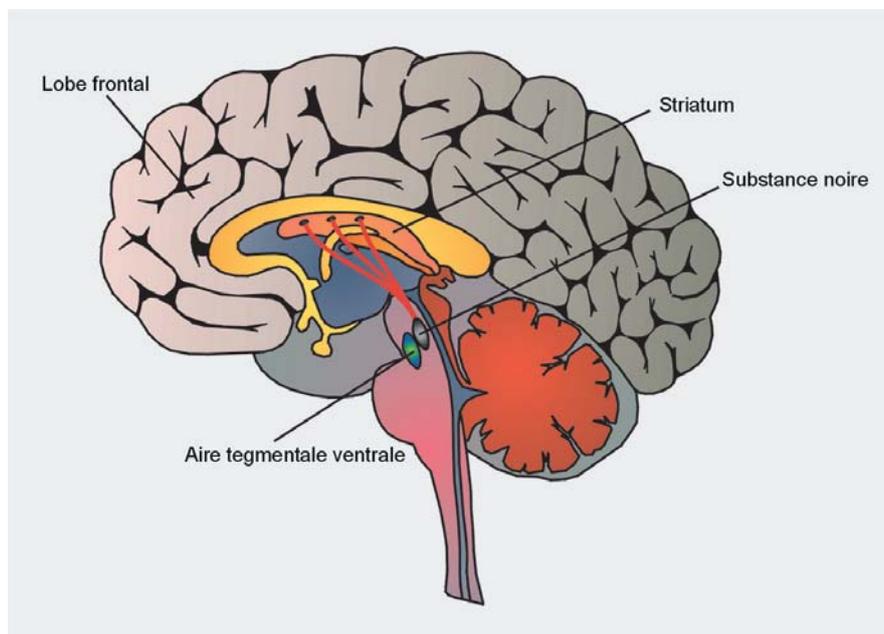


Figure 1.1: Coupe de cerveau montrant la localisation de la substance noire [6].

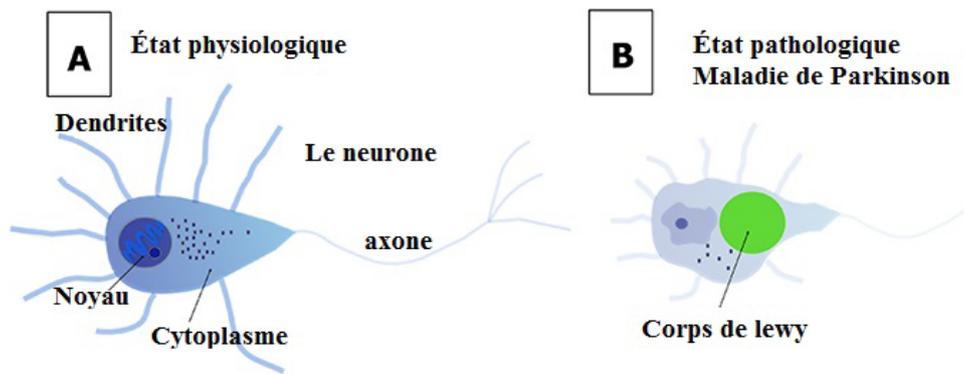


Figure 1.2: Corps de Lewy [7].

1.2 Physiopathologie

De nombreuses structures cérébrales jouent un rôle important dans le comportement et dans l'élaboration des mouvements. Les noyaux gris centraux (i.e. ganglions de la base) y ont un rôle de contrôle central dont le déséquilibre joue un rôle déterminant dans la pathogenèse de la MP. Ils comprennent, de chaque côté : le ST (i.e. noyau caudé et putamen), le pallidum (i.e. globus pallidus interne et externe), le noyau sous-thalamique (STN) et le locus niger (i.e. substance noire pars compacta « SNpc » et pars reticulata « SNpr ») [8]. Les neurones dopaminergiques de la SNpc (les neurones de la SNpc produisent des catécholamines, principalement la DA) envoient leurs axones le long de la voie nigrostriatale vers le striatum (ST), où la dopamine (DA) agit pour moduler la signalisation post-synaptique (figure 1.3). Le ST comprend une population hétérogène de neurones qui reçoit des données provenant d'un certain nombre de régions, y compris les cortex moteurs et sensoriels, et sous l'influence de la DA utilise ces informations pour guider le comportement moteur. La perte substantielle de cette innervation DAergique est responsable des symptômes de la MP [8, 9].

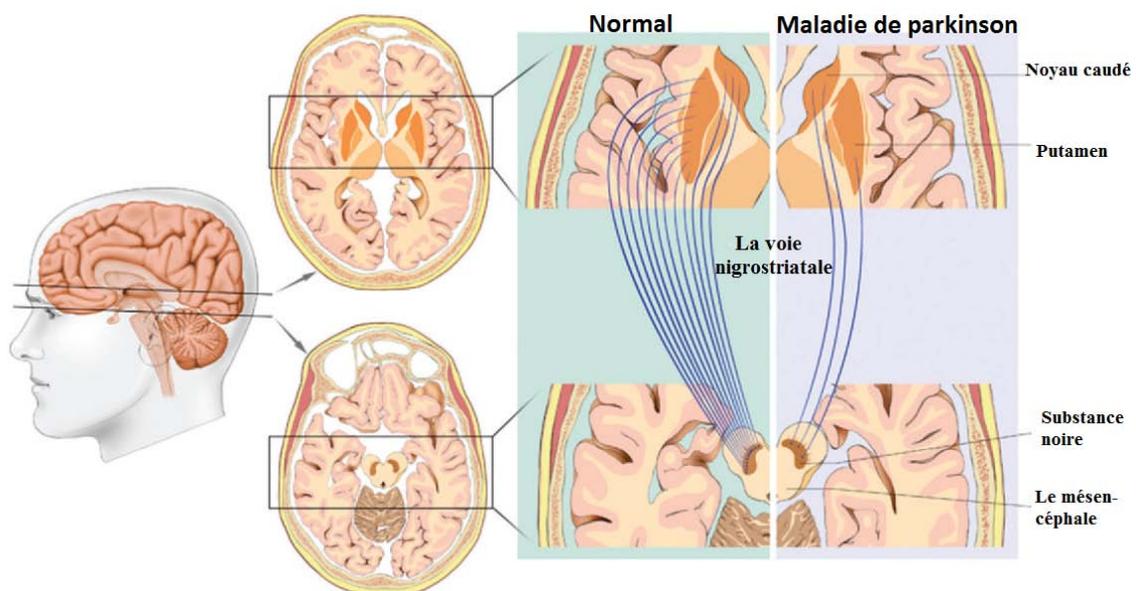


Figure 1.3 : Une perte des neurones DAergiques qui se projettent de la SNpc jusqu'au ST dans la MP [10].

1.3 Anatomopathologie

La MP se caractérise par la perte de neurones DAergiques de la substance noire associée à la présence d'inclusions intraneuronales appelées corps de Lewy.

Le degré de sévérité des symptômes moteurs corrèle avec l'importance de la perte des cellules nerveuses [11]. On estime qu'au moins 50 % des neurones nigraux doivent dégénérer pour produire des symptômes. A l'autopsie, la plupart des cas montrent une réduction de plus de 80 % de ces neurones. La disparition des neurones nigraux entraîne une chute progressive des taux de DA dans le ST [11, 12]. La perte de ces neurones, qui contiennent des quantités remarquables de neuromélanine, produit la découverte neuropathologique macroscopique classique de dépigmentation de la SNpc (figure 1.4) [13].

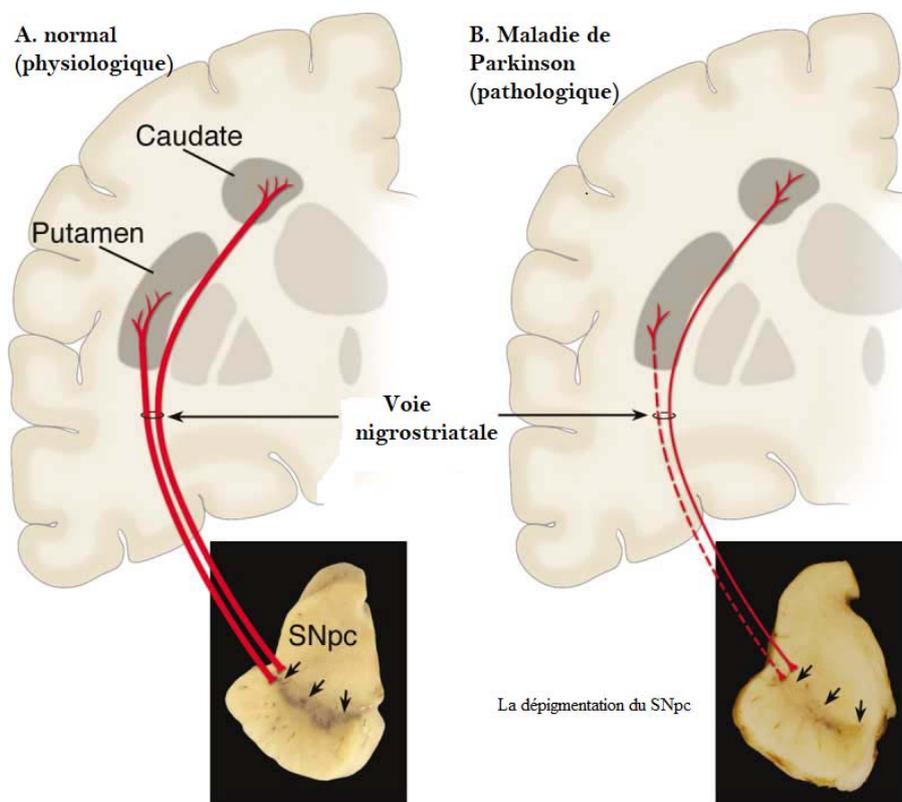


Figure 1.4 : La dépigmentation de la SNpc [13].

1.4 Le Système Dopaminergique

La DA est un neurotransmetteur de la famille des catécholamines qui est produite par les neurones DAergiques. Le système DAergique est impliqué dans la récompense, la locomotion, la motivation

et de nombreux autres processus [14]. La DA intervient dans plusieurs voies qu'on appelle : les voies DAergiques. La voie Nigro-Striatale ou nigrostriée, dans laquelle les neurones DAergiques de la SNpc projettent en majorité dans le ST, représente 80 % des neurones DAergiques centraux. Cette voie est particulièrement impliquée dans la production de mouvements et sa dégénérescence conduit à la MP [15]. Les autres voies (mésolimbique, mésocorticale et tubéro-infundibulaire) sont impliquées dans d'autres rôles tels que la cognition et la sécrétion de certaines hormones.

1.4.1 Biosynthèse de la dopamine

Dans le SNC (Système nerveux central), la DA est synthétisée à partir de l'acide aminé L-Tyrosine qui est transmise du sang vers le liquide extracellulaire cérébral puis vers le cytosol des neurones DAergiques par des transporteurs d'acides aminés. La biosynthèse de la DA s'effectue en deux étapes, commençant par l'hydroxylation de la L-tyrosine par la Tyrosine Hydroxylase (TH) pour donner la (L)-3,4 dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) qui, à son tour, donne naissance à la DA après une décarboxylation par la DOPA décarboxylase (DDC). La DA synthétisée est facilement séquestrée dans les vésicules synaptiques par l'action du transporteur vésiculaire monoamine 2 (VMAT2). La DA qui fuit des vésicules est désactivée par la monoamine oxydase (MAO) [16].

Lors de l'excitation neuronale, la DA est libérée par exocytose dans la fente synaptique pour la transduction du signal. La signalisation s'arrête par réimportation et recyclage dans les neurones pré-synaptiques via le transporteur membranaire sélectif de la DA (DAT) [17], ou par dégradation par la catéchol-O méthyl transférase (COMT), la MAO, l'alcool déshydrogénase (ADH) et l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). Les principaux produits de dégradation de la DA sont le DOPAC (l'acide dihydroxyphénylacétique) et le HVA (Acide homovanilique) (figure 1.5). Il convient de noter que la COMT est principalement exprimée par les cellules gliales. Dans les neurones, cette enzyme est soit absente, soit trouvée à des niveaux très bas [14].

Les actions physiologiques de la DA sont médiées par cinq récepteurs couplés aux protéines G, et sur la base de leurs propriétés structurelles, pharmacologiques et biochimiques, ces récepteurs ont été regroupés en deux familles : récepteurs DAergiques de classe D1 (D1 et D5) ou récepteurs de DA de classe D2 (D2, D3 et D4). Selon le type de récepteur, la DA peut être stimulante ou inhibitrice [15].

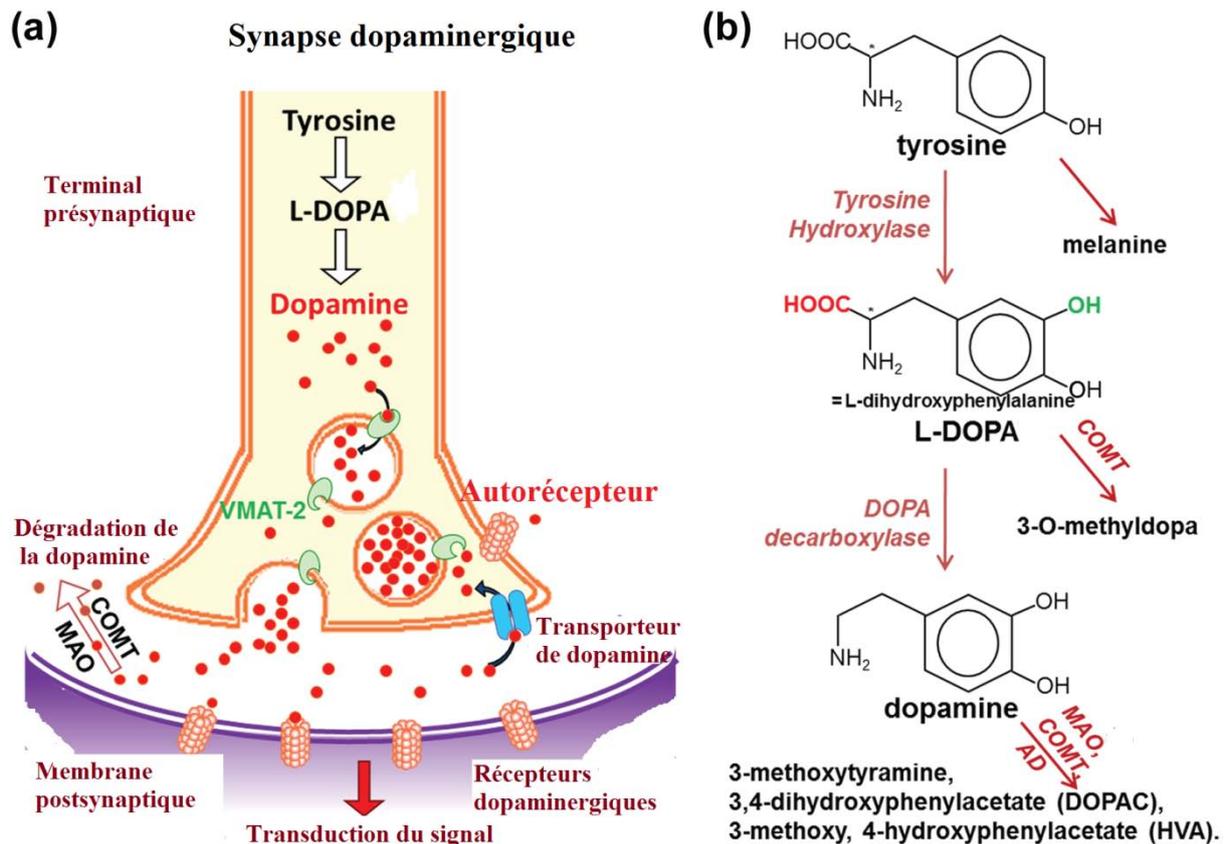


Figure 1.5: Synapse DAergique et métabolisme de la DA [18].

MAO: monoamine oxydase; COMT: catéchol-O méthyl transférase

1.5 Étiologie

Bien qu'il soit évident que le vieillissement est le plus grand facteur de risque, la cause exacte de la MP n'est pas encore connue. Elle serait d'origine multifactorielle combinant des facteurs génétiques et/ou environnementaux [19] :

1.5.1 Facteurs génétiques

Les chercheurs ont identifié quelques gènes causaux de Parkinson où les mutations génétiques augmentent considérablement le risque. Ces mutations sont néanmoins peu courantes (environ 5 à 10 % des cas de Parkinson), sauf dans des formes rares et héréditaires de la maladie [20]. La MP ne touche pas la totalité des porteurs de ces mutations génétiques, d'autres facteurs doivent jouer un rôle. L'étude de la génétique, cependant, donne aux scientifiques un point de départ pour mieux comprendre la maladie [19].

1.5.2 Facteurs environnementaux:

Les études épidémiologiques indiquent qu'un certain nombre de facteurs peuvent augmenter le risque de développer une MP.

1.5.2.1 Métaux

Plusieurs métaux sont des cofacteurs essentiels pour les enzymes et sont nécessaires pour le fonctionnement optimal de divers processus cellulaires. Cependant, l'exposition professionnelle prolongée aux métaux, y compris le manganèse, le fer, le mercure, le zinc, l'aluminium, le cuivre et le plomb, peut constituer un facteur de risque de la MP [21].

1.5.2.2 Pesticides

L'exposition à des pesticides (ROT, Paraquat/Maneb, pesticides organochlorés et organophosphates) peut être responsable de la dégénérescence des neurones DAergiques du SNC participant ainsi au développement de la MP [22, 23]. Ces éléments conduisent à un dysfonctionnement des mitochondries et à l'activation des microglies, induisant donc la production des ERO (espèces réactive de l'oxygène) toxiques pour les neurones [24].

1.5.3 Combinaison de facteurs

La génétique, l'environnement et le vieillissement interagissent pour provoquer la MP. Pas tout porteur de mutation génétique liée à la MP ne développera cette maladie. De même, pas toute personne exposée à un pesticide ne sera diagnostiquée. Le rôle de la susceptibilité génétique comme facteur modulateur est souvent évoqué ; en effet, des polymorphismes de certains gènes pourraient intervenir et expliquer que certaines personnes soient plus susceptibles que d'autres aux facteurs environnementaux (interaction gène-environnement) [25].

Références bibliographiques

- [1] Larner, AJ. History of Neurology: Parkinson's Disease Before James Parkinson. ACNR. 2014; 13(7):24-5.
- [2] Parkinson J. An Essay on the Shaking Palsy. London: Whittingham and Rowland for Sherwood, Neely, and Jones; 1817.
- [3] Donaldson IM. James Parkinson's essay on the shaking palsy. J.R. Coll. Physicians Edinb. 2015; 45:84–86.
- [4] Huda Y. Zoghbi. From Anatomy to Electrophysiology: Clinical Lasker Goes Deep. Cell. 2014; 158(6):1225-1228.
- [5] Del Rey NL-G, Quiroga-Varela A, Garbayo E, Carballo-Carbajal I, Fernández-Santiago R, Monje MHG, Trigo-Damas I, Blanco-Prieto MJ et Blesa J. Advances in Parkinson's Disease: 200 Years Later. Front Neuroanat. 2018; 12:113.
- [6] INSERM. Pesticides. Effets sur la santé. Collection expertise collective, Chapitre 23 : Mécanismes d'action neurotoxique des pesticide. Inserm, Paris, 2013; 765-830.

- [7] Mitrofanis J. Run in the Light Exploring exercise and photobiomodulation in Parkinson's disease. Chapter 1: Parkinson's disease. Morgan & Claypool Publishers, 2019.
- [8] Chu H. Synaptic and cellular plasticity in Parkinson's disease. *Acta Pharmacol Sin.* 2020; 41:447–452.
- [9] Galvan A, Devergnas A, Wichmann T. review: Alterations in neuronal activity in basal ganglia-thalamocortical circuits in the parkinsonian state. *Frontiers in Neuroanatomy.* 2015; 9:1-21.
- [10] Broski SM, Hunt CH, Johnson GB, Morreale RF, Lowe VJ, Peller PJ. Structural and Functional Imaging in Parkinsonian Syndromes. *RadioGraphics.* 2014; 34(5):1273-1292.
- [11] Mackenzie, Ian RA. The pathology of parkinson's disease. *BCM J.* 2001; 43 (3):142-147.
- [12] Masato A, Plotegher N, Boassa D, Bubacco L. Impaired dopamine metabolism in Parkinson's disease pathogenesis. *Mol Neurodegeneration.* 2019; 14:35.
- [13] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron.* 2003; 39(6):889–909.
- [14] Juárez Olguín H, Calderón Guzmán D, Hernández García E, Barragán Mejía G. The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2016; 1–13.
- [15] Ayano G. Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures. *Journal of Mental Disorders and Treatment.* 2016; 2(2).
- [16] Block ER, Nuttle J, Balcita-Pedicino JJ, Caltagarone J, Watkins SC, Sesack SR, Sorkin A. Brain Region-Specific Trafficking of the Dopamine Transporter. *Journal of Neuroscience.* 2015; 35:12845–12858.
- [17] Meiser J, Weindl D, Hiller K. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal.* 2013; 11(1):34.
- [18] Jones DR, Moussaud S, McLean P. Targeting heat shock proteins to modulate α -synuclein toxicity. *Ther Adv Neurol Disord.* 2014; 7(1):33-51.
- [19] Zeng XS, Geng WS, Jia JJ, Chen L, Zhang PP. Cellular and Molecular Basis of Neurodegeneration in Parkinson Disease. *Front Aging Neurosci.* 2018; 10:109.
- [20] Kalinderi K, Bostantjopoulou S, Fidani L. The genetic background of Parkinson's disease: current progress and future prospects. *Acta Neurologica Scandinavica.* 2016; 134(5): 314–326.
- [21] Kwakye GF, Paoliello MM, Mukhopadhyay S, Bowman AB, Aschner M. Manganese-Induced Parkinsonism and Parkinson's Disease: Shared and Distinguishable Features. *Int J Environ Res Public Health.* 2015; 12(7):7519-40.
- [22] Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci.* 2015; 9:124.

- [23] Nandipati S, Litvan I. Environmental Exposures and Parkinson's Disease. *Int J Environ Res Public Health*. 2016; 13(9).
- [24] Dick FD, De Palma G, Ahmadi A, Scott NW, Prescott GJ, Bennett J, Semple S, Dick S, Counsell C, Mozzoni P, Haites N, Wettinger SB, Mutti A, Otelea M, Seaton A, Söderkvist P, Felice A; Geoparkinson study group.. Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. *Occup Environ Med*. 2007; 64(10):666-72.
- [25] Moisan F, Elbaz A. Maladie de Parkinson et exposition aux pesticides. *Environ Risque Sante*. 2011; 10:372-84. doi : 10.1684/ers.2011.0482.

Chapitre 2 : Les mécanismes de la neurodégénérescence dans la maladie de Parkinson et l'implication de l'apoptose

2.1 Mécanismes de neurodégénération dans la maladie de Parkinson

De nombreux mécanismes cellulaires ont été proposés comme causes potentielles. Les théories abondent sur les mécanismes cellulaires derrière la destruction des neurones DAergiques ainsi que sur la contribution ou la relation existant avec l'autre découverte pathologique répandue, l' α -Syn et corps de Lewy [1]. Il pourrait s'agir de l'accumulation des RL, d'un déficit énergétique ou métabolique, ou encore d'un processus inflammatoire ou excitotoxique (figure 2.1), comme expliqué ci-dessous [2, 3].

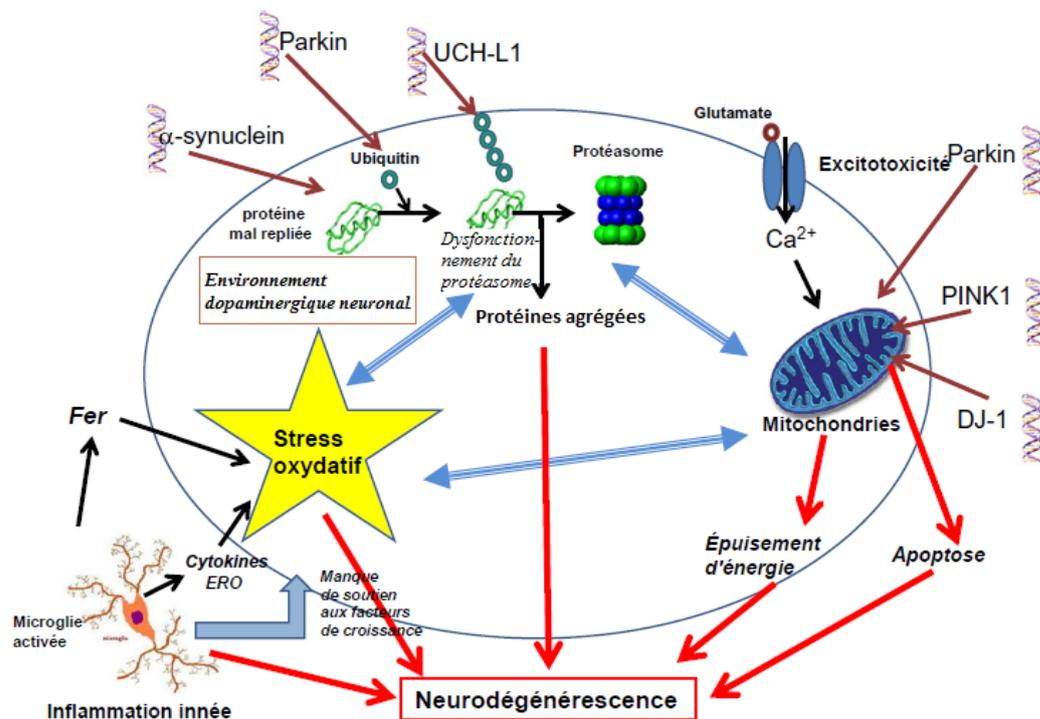


Figure 2.1: Mécanismes moléculaires clés contribuant au processus neurodégénératif des neurones DAergiques de la SNpc dans la MP [3].

Ca^{2+} : Calcium; α -synucleine, UCH-L1, PRKN, PINK-1 et DJ-1 : mutations génétiques les plus connues dans la MP; ERO: espèces réactives de l'oxygène.

2.1.1 Altérations de la fonction α -synucleine

Les corps de Lewy contenant de l' α -Syn est la découverte cellulaire répandue dans la MP. L' α -Syn est une protéine présynaptique dont la fonction n'a pas encore été identifiée, mais son contenu neuronal augmente chez les patients atteints de synucléinopathies, y compris la MP [4]. La recherche a montré que la surexpression ou l'altération de l' α -Syn peut : interférer avec la fonction

protéasomique et lysosomale, favoriser les lésions mitochondriales, augmenter les niveaux de fer toxique, limiter la production de DA en interférant avec la TH et aggraver la libération de vésicules présynaptiques neuronales [1, 3].

En ce qui concerne les interactions α -Syn et DA, α -Syn régule physiologiquement le compactage des vésicules et la libération de la DA. Cependant, dans l'état pathologique de la MD, α -Syn élevé ou muté altère l'amarrage des vésicules et aussi empêchant l'incorporation vésiculaire; ces défauts dans la manipulation de la DA cytoplasmique aboutit finalement à la rétention d'une concentration élevée de DA libre [4, 5]. Le processus de repliement de l' α -Syn peut résulter soit de mutations génétiques, responsables de formes familiales de la maladie, soit de modifications post-traductionnelles de la protéine principalement dues au stress oxydatif / nitrosatif (figure 2.2) [6].

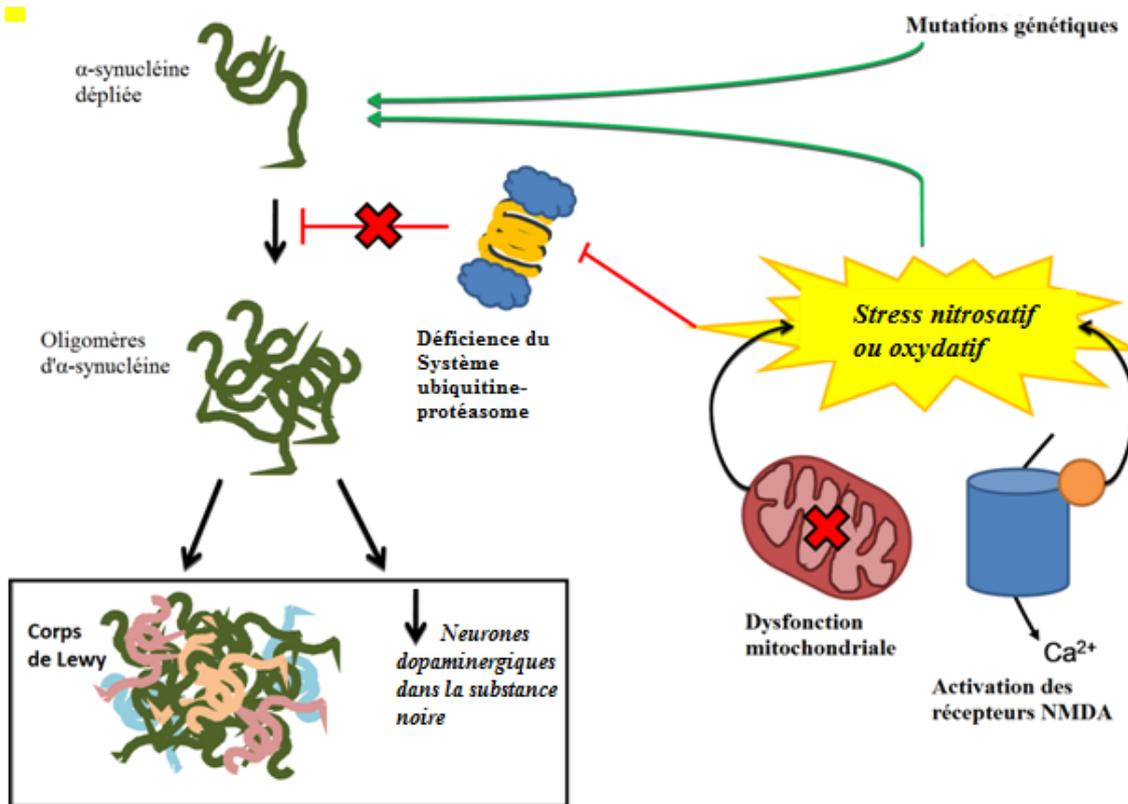


Figure 2.2: Le processus de repliement de l' α -Syn [6].

Ca²⁺: Calcium; NMDA: N-Methyl-D-aspartate.

2.1.2 Auto-oxydation de la dopamine

Le métabolisme pré synaptique augmenté de neurotransmetteurs provoque l'auto-oxydation chimique de la DA et aussi son catabolisme par la MAO conduisant à la production de RL et à l'altération de l'état redox des terminaisons nerveuses DAergiques dans le ST. L'action de la MAO sur la DAc produit le DOPAL (Dopamine 3,4-dihydroxyphényl-acétaldéhyde). Ce dernier est détoxifié principalement par l'ALDH pour former le DOPAC, et le 3,4-dihydroxyph-ényléthanol

(DOPET), un métabolite mineur formé via l'aldéhyde/aldose réductase. La DA cytosolique (DAc) et le DOPAL s'auto-oxydent spontanément en quinones, ce qui augmente la génération d'espèces réactives de l'oxygène, entraînant une peroxydation lipidique. Le 4-Hydroxynonanal (4HNE), un produit majeur de la peroxydation lipidique, inhibe l'ALDH. Le DOPAL se réticule avec des protéines augmentant l'oligomérisation de l'alpha-synucléine (figure 2.3). L'auto-oxydation de la DAc conduit à la production des dopaquinones (quinines ou semiquinones DA) et de l'O₂⁻ (Radical anion superoxyde) [7]. Cette réaction est catalysée par des métaux, de l'oxygène ou des enzymes comme la tyrosinase. L'O₂⁻ est métabolisé en H₂O₂ (Peroxyde d'hydrogène) ou réagit avec l'oxyde nitrique (NO), produisant le peroxynitrite (ONOO⁻) et entraînant la mort des cellules [8, 9]. La dopaquinone peut provoquer la modification d'un certain nombre de protéines liées à la MP, le dysfonctionnement mitochondrial et celui de l'activité du CI de la chaîne respiratoire [8, 9].

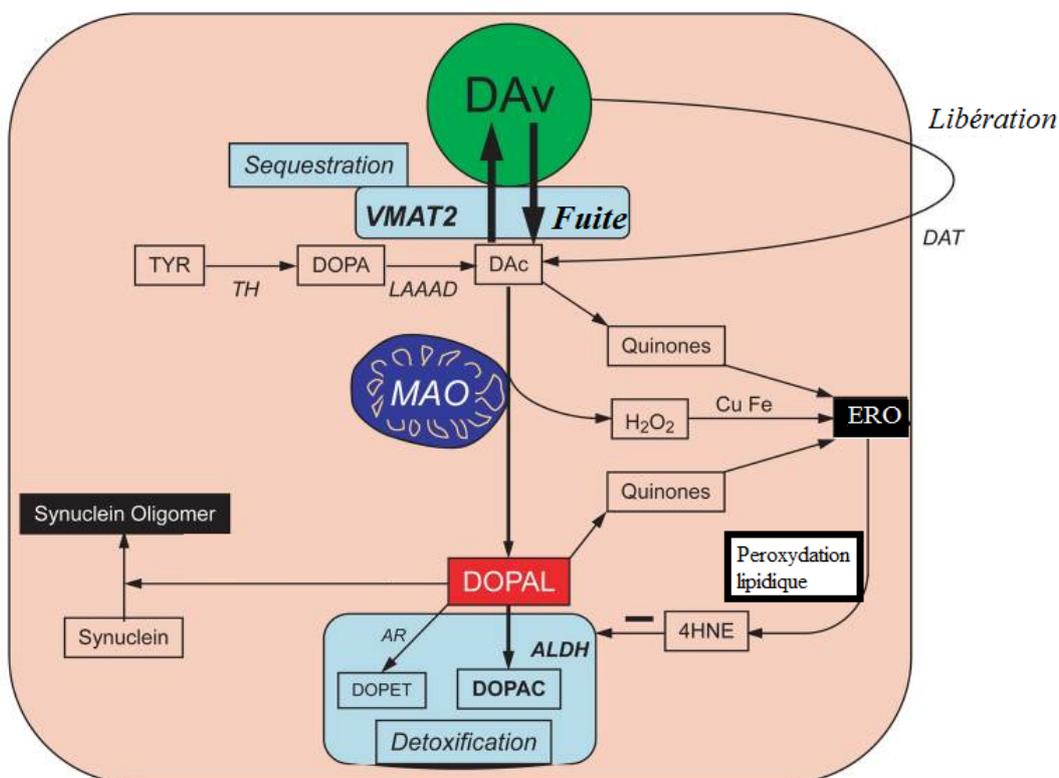


Figure 2.3: Diagramme conceptuel sur les sources et le devenir métabolique du DOPAL dans les neurones dopaminergiques. TYR: Tyrosine; DAc: DA cytosolique; DAV: Dopamine des vésicules; MAO: monoamine oxydase; DOPAL: 3,4-dihydroxyphényl-acétaldéhyde; ALDH: l'aldéhyde déshydrogénase; VMAT: transporteur vésiculaire monoamine; TH: Tyrosine Hydroxylase; DOPAC: l'acide dihydroxyphénylacétique; DOPET: 3,4-dihydroxyphénylethanol; AR: aldéhyde/aldose réductase ; 4HNE: Le 4-Hydroxynonanal.

2.1.3 Les dépôts de fer

De nombreuses études ont montré une augmentation sélective de la teneur en fer tissulaire dans les cerveaux des PcP (Personne cum Parkinson) dans les zones associées à la destruction la plus élevée des neurones DAergiques [10].

Les cellules DAergiques semblent être sélectivement endommagées et sensibles à l'excès de fer qui est impliqué dans des réactions chimiques productrices de RL (ex : réaction de Fenton ou catabolisme de la DA elle-même) [9, 11, 12]. Le fer devient toxique dans les neurones DAergiques en (i) réagissant avec le H_2O_2 produit dans les processus enzymatiques du métabolisme de la DA, et (ii) en accélérant les processus catalytiques non enzymatiques et en produisant des intermédiaires neurotoxiques ou des produits finaux (O_2^- et $\cdot OH$) [12].

La saturation de la neuromélanine, probable réservoir du fer excessif et liant des RL, peut entraîner une plus grande toxicité cellulaire [13]. Il existe également des preuves que le fer peut augmenter les niveaux d'agrégation α' -Syn. Le fer cytoplasmique élevé provoque un environnement dangereusement pro-oxydant. L' α -Syn surexprimé augmente l'activité de la ferriréductase et les niveaux de fer ferreux. L'autoxydation de la DA favorise l'agrégation d' α -Syn et les produits métaboliques réagissent avec le fer. Ceux-ci manifestent un cercle vicieux toxique entre le fer, la DA et l' α -Syn dans la MP (figure 2.4) [12]. La découverte récente d'un nouveau mécanisme de mort cellulaire programmée non apoptotique dépendante du fer, appelée ferroptose, qui prédomine dans la MP [10].

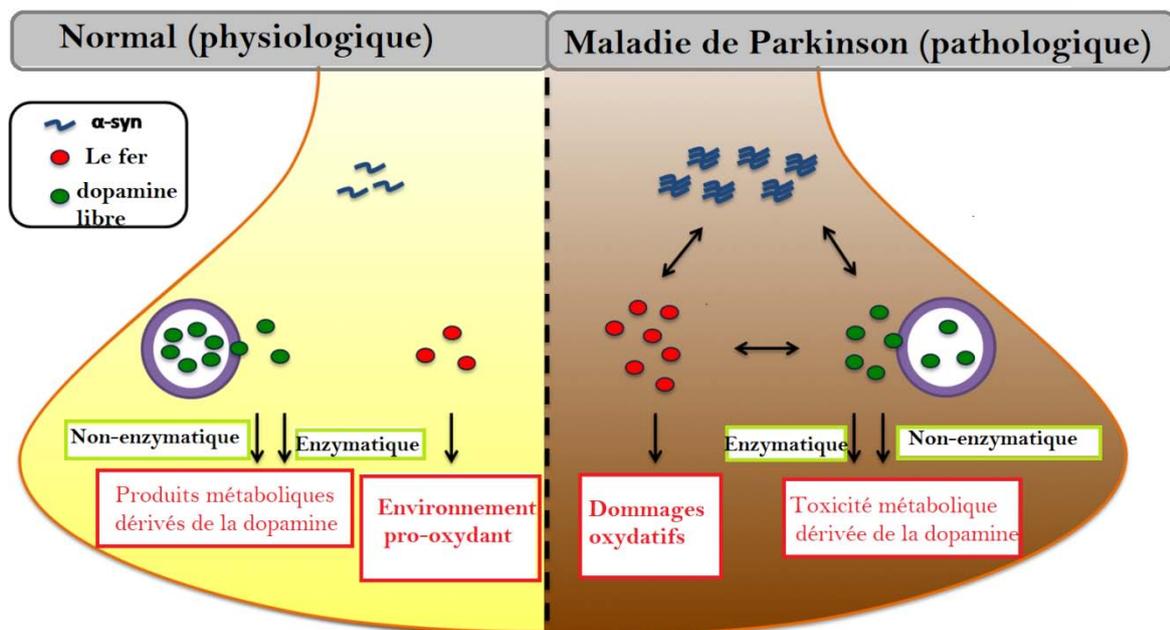


Figure 2.4: Fer, DA et α -Syn dans les neurones DAergiques [12].

2.1.4 Dysfonctionnement mitochondrial

Les troubles mitochondriaux ont été largement impliqués dans les maladies neurodégénératives, y compris la MP [14, 15]. Il a été démontré que de nombreux gènes nucléaires mutés liés aux formes familiales de la MP, y compris PINK1, Parkin, α -Syn, DJ-1 ou LRRK2, affectent un bon nombre des caractéristiques mitochondriales [16]. Des études récentes suggèrent que le vieillissement provoque une augmentation des mutations de l'ADN (Acide désoxyribonucléique) mitochondrial dans les neurones conduisant à une perte d'activité dans le C I et donc à un dysfonctionnement mitochondrial [15].

De nombreuses études ont démontré à plusieurs reprises que l'expression et l'activité du C I sont nettement réduites dans la MP [17]. Des modifications dans plusieurs aspects de la biologie des mitochondries ont été liées à la pathogenèse de la MP, telles que : (a) une activité réduite du C I, (b) une production accrue des ERO dérivés des mitochondries, (c) des dommages à l'ADNmt (ADN mitochondriale) induits par les ERO, (d) un échec bioénergétique, (e) une libération du cytochrome C (Cyt C) induite par le Bax (protéine pro-apoptotiques) et activation des voies apoptotiques dépendantes des mitochondries, (f) une mitophagie défectueuse, ou (g) une augmentation de la charge mitochondriale de calcium Ca^{2+} (figure 2.5) [16]. On pense que la SNpc est plus vulnérable au dysfonctionnement du C I par rapport aux autres régions du cerveau en raison de la génération des ERO par les neurones DAergiques nigraux au cours du métabolisme de la DA. Les dommages oxydatifs aux sous-unités du C I peuvent conduire à son déficit [18]. Les mitochondries jouent un rôle clé dans le contrôle du calcium cytosolique Ca^{2+} et du métabolisme cellulaire. Par conséquent, la dyshoméostasie mitochondriale du Ca^{2+} a été liée de façon pathogène à la neurodégénérescence survenant dans la MP [19].

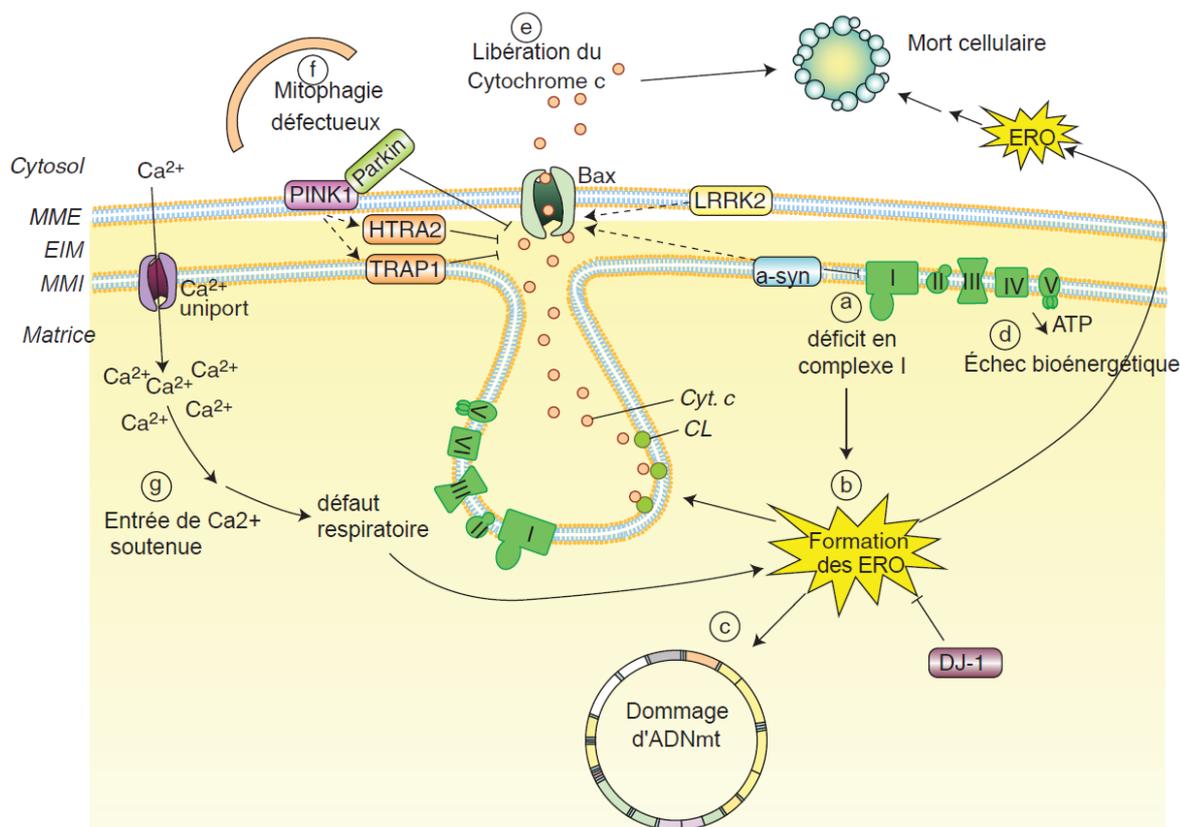


Figure 2.5: Dysfonctionnement mitochondrial dans la MP [16]. CL: cardiolipine; Cyt C: cytochrome C; HTRA2: exigence haute température A2; MMI: membrane mitochondriale interne; EIM: espace intermembranaire; LRRK2: kinase 2 à répétition riche en leucine; MME: membrane mitochondriale externe; PINK1: phosphatase et tensine kinase 1 induite par un homologue; ERO: espèces réactives de l'oxygène; TRAP1: associé au récepteur du facteur de nécrose tumorale protéine 1; α -Syn: alpha-synucléine; ADNmt: ADN mitochondriale.

2.1.5 Stress oxydatif

Le stress oxydatif se produit lorsqu'un déséquilibre est formé entre la production d'ERO et l'activité antioxydante cellulaire [20]. Le système nerveux est riche en acides gras insaturés et en fer. La forte teneur en lipides du tissu nerveux, associée à sa forte activité métabolique, le rend particulièrement vulnérable aux dommages oxydatifs. De plus, les régions du cerveau riches en catécholamines sont exceptionnellement vulnérables à la génération de RL. Une de ces régions du cerveau est la SN, où un lien a été établi entre l'épuisement des antioxydants et la dégénérescence des tissus [21]. Un stress oxydatif modéré peut déclencher une cascade d'événements menant à la mort des cellules. Les causes principales de ce stress oxydatif sont les ERO générées par les neurones DAergiques nigraux au cours du métabolisme de la DA, du dysfonctionnement mitochondrial et de la neuroinflammation (figure 2.6) [20].

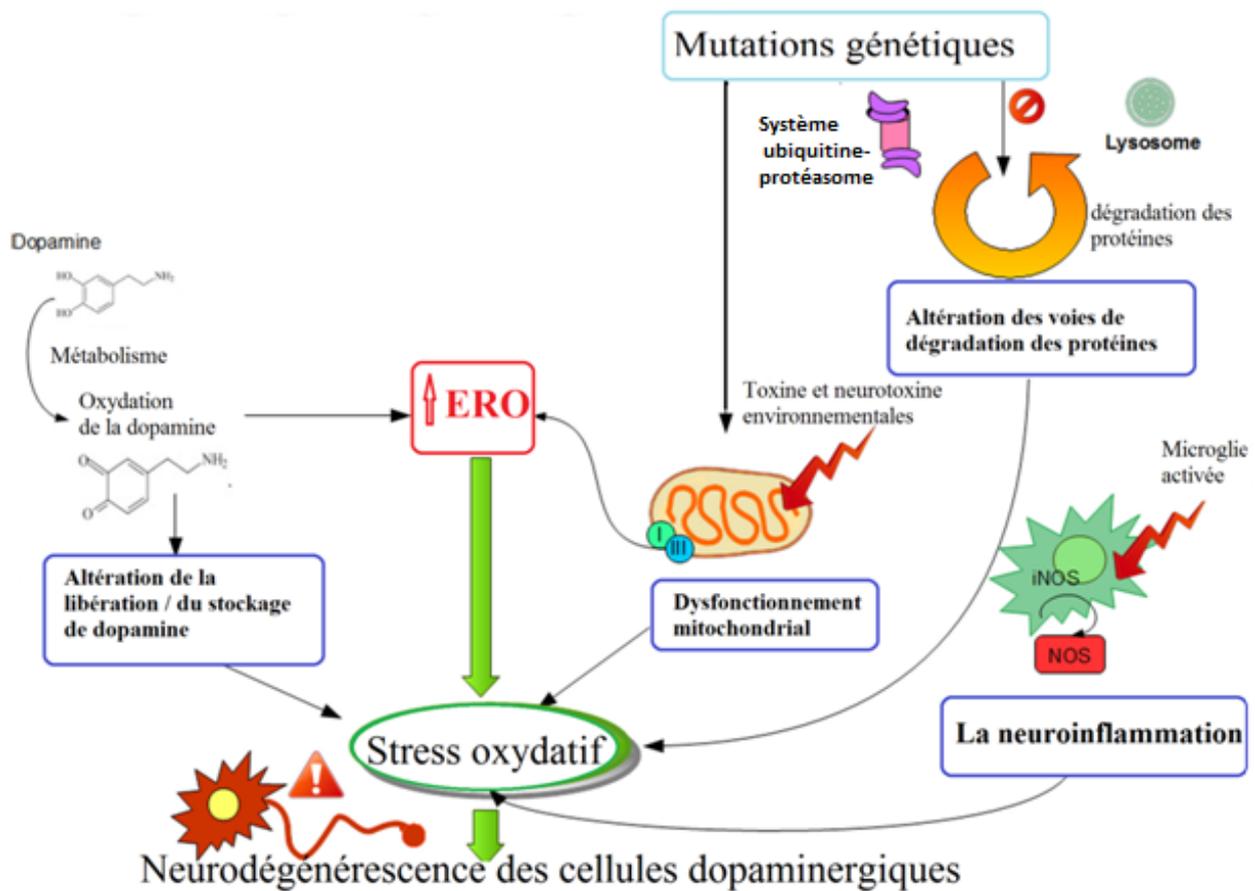


Figure 2.6: Mécanismes cellulaires possibles attribués au stress oxydatif dans la MP [8]

ERO: Espèce Réactive de l'Oxygène; iNOS: Oxyde nitrique synthétase inductible; NOS: NO synthase.

La formation excessive des ERO et ERA (Espèces Réactive de l'azote) dans la MP peut endommager des composants cellulaires essentiels tels que les lipides, les protéines et l'ADN. Les preuves de dommages oxydatifs dans le cerveau des PcP comprennent : l'augmentation de la quantité de produits de peroxydation lipidique, l'augmentation de l'oxydation des protéines [23], et l'augmentation de la concentration en 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine, un produit de l'oxydation de l'ADN [23]. En plus d'être le site de la génération des ERO, la mitochondrie peut également être affectée par les ERO dans les cellules DAergiques. Par exemple, des études ont montré que des dommages oxydatifs tels que la S-nitrosylation du C I peuvent inhiber son activité normale [22]. En raison de ces altérations observées, «l'hypothèse des RL» est devenue essentielle pour tenter d'expliquer l'étiologie de la MP [23]. De plus, l'examen cérébral et l'utilisation de diverses techniques analytiques ont démontré des changements dans les concentrations normales en antioxydants chez les PcP (figure 2.7) [24].

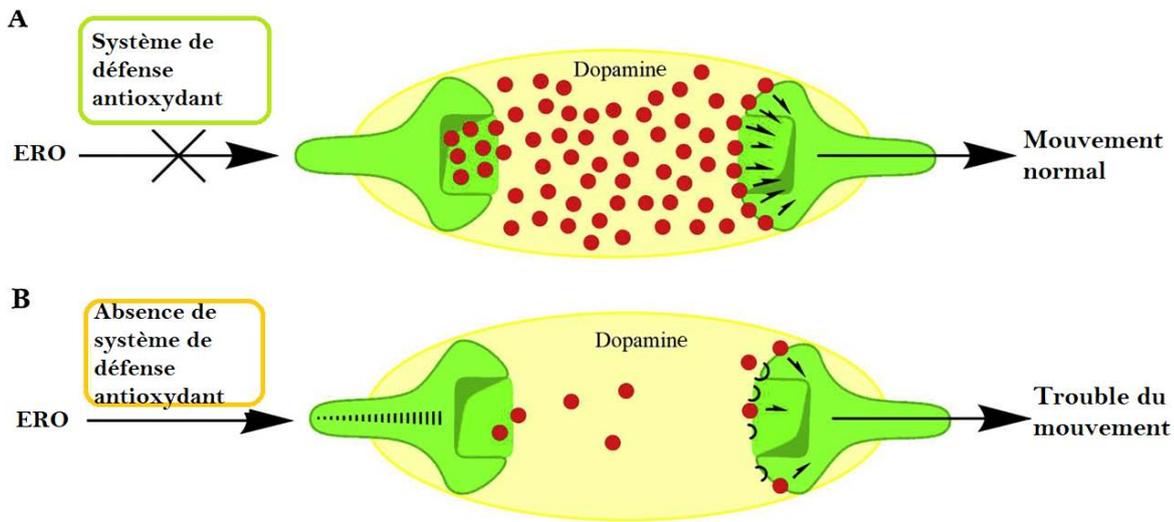


Figure 2.7: Les systèmes antioxydants aident à neutraliser les ERO du corps. Système de défense antioxydant puissant (A). Système de défense antioxydant Faible (B) [25].

ERO: Espèce Réactive de l'Oxygène.

2.1.6 L'excitotoxicité et l'homéostasie du calcium

Le concept d'excitotoxicité a également été impliqué dans la mort des neurones DAergique. L'excitotoxicité est un processus pathologique d'altération et de destruction neuronale, consécutif à l'hyper activation des récepteurs de glutamate (ex les récepteurs N-Methyl-D-aspartate (NMDA)) [15]. En cas de stress énergétique (niveaux d'ATP bas), les neurones ont du mal à maintenir leur potentiel de membrane ce qui peut entraîner une activation persistante des récepteurs par le glutamate ambiant. Dans la MP, l'excitotoxicité a comme origine le déficit énergétique consécutif au dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Une autre théorie suggère que les neurones de la SNpc pourraient être soumis à une signalisation excessive du glutamate du cortex et du STN [6]. Comme toutes les cellules de l'organisme, les cellules DAergiques sont sensibles à une augmentation intracellulaire de concentration en calcium Ca^{2+} libre (figure 2.8). Une quantité excessive de Ca^{2+} conduit à la mort cellulaire par de multiples voies potentielles, y compris la dysfonction mitochondriale, le stress oxydatif, la dysfonction du RE (Réticulum endoplasmique) et la signalisation dérégulée via des enzymes dépendantes du Ca^{2+} [15].

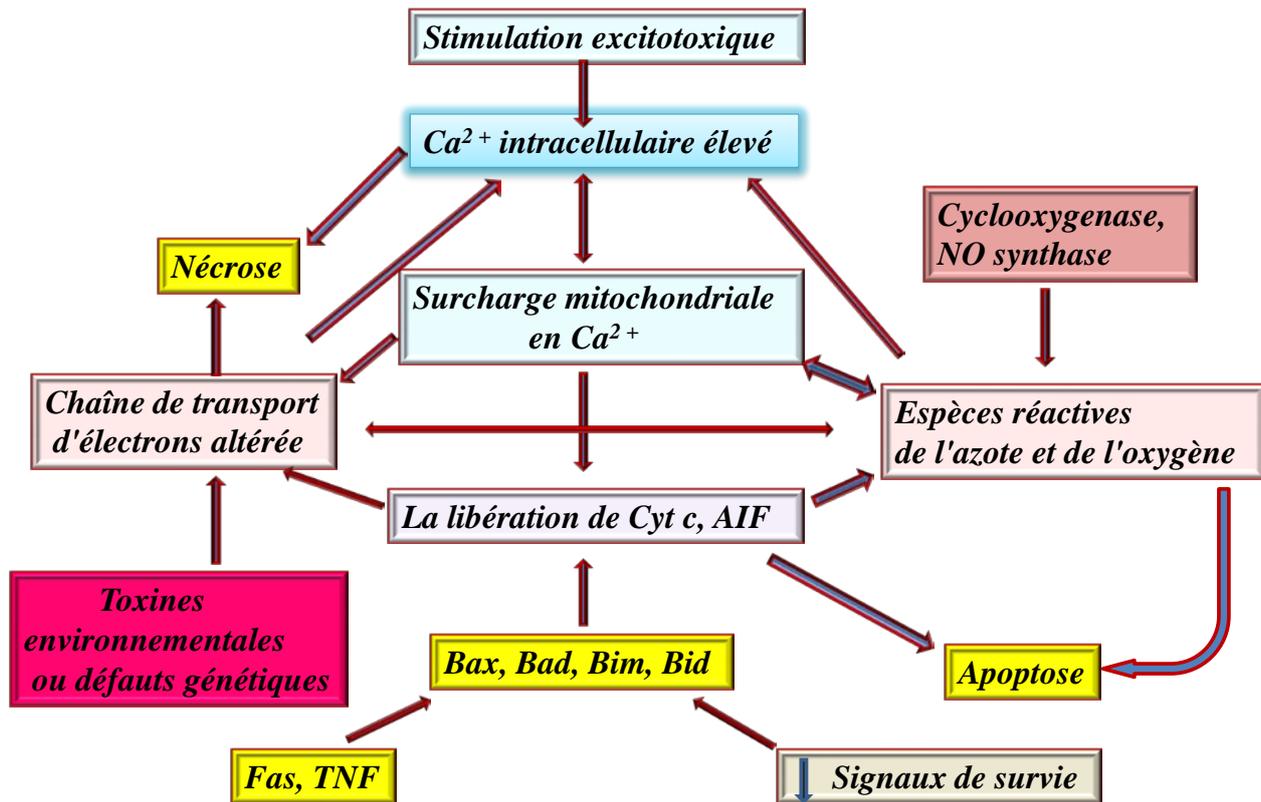


Figure 2.8 : Excitotoxicité et élévation des taux de calcium induisent la mort cellulaire [26].

AIF: facteur induisant l'apoptose; Cyt C: Cytochrome C; NO: Oxyde nitrique; Ca²⁺: calcium; TNF: facteur de nécrose tumorale ; Bid/Bax/Bad/Bim: pro-apoptotiques.

2.1.7 La neuroinflammation (l'Activation gliale)

La neuroinflammation est caractérisée par des cellules microgliales activées qui sont les cellules immunitaires résidentes du cerveau. La perte neuronale de la MP est associée à une neuroinflammation chronique, contrôlée principalement par la microglie (figure 2.9) [20]. La microglie activée est une source importante de superoxyde et d'oxyde nitrique, qui contribuent à leur tour au stress oxydatif. Ces cellules peuvent également favoriser la neurodégénérescence en produisant d'autres agents potentiellement toxiques tels que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) [27].

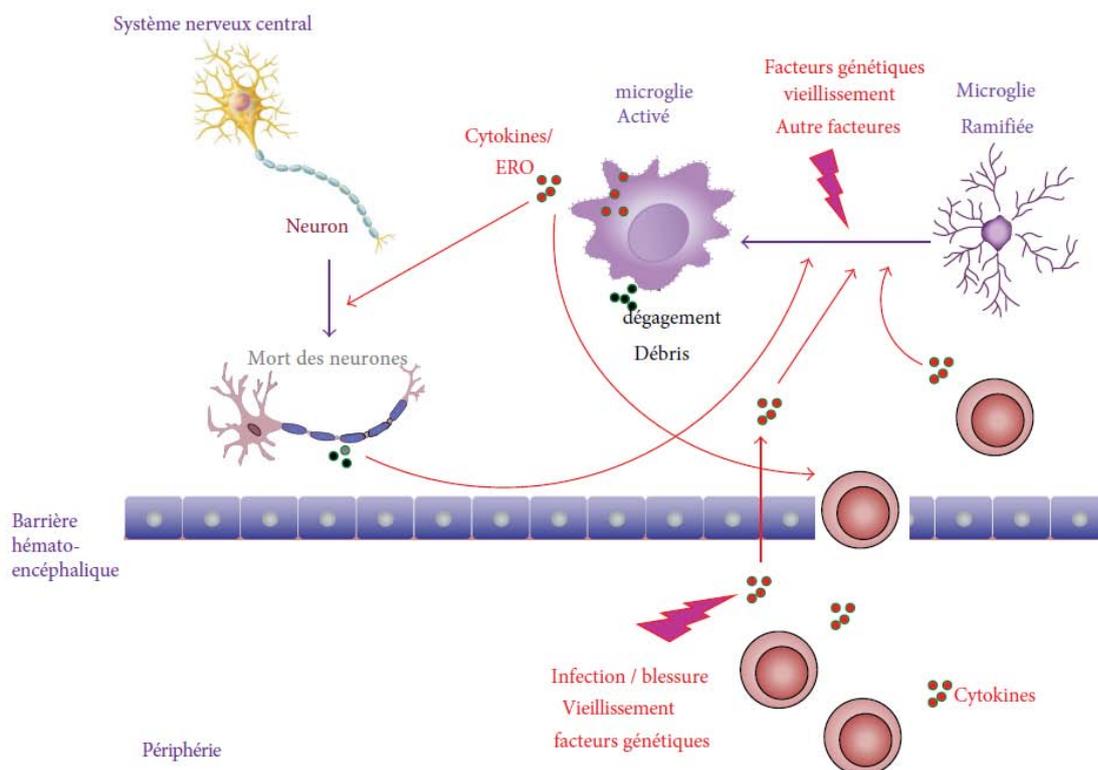


Figure 2.9: Un cercle vicieux neuroinflammatoire qui peut avoir lieu dans la MP [28].

ERO: Espèce Réactive de l'Oxygène.

2.1.8 Système Ubiquitin-Proteasome :

Le système ubiquitine-protéasome (SUP) est la principale voie par laquelle les cellules se dégradent et éliminent les protéines endommagées et indésirables. Pendant le stress oxydatif, l'élimination efficace de ces matières indésirables par le protéasome est considérée comme un mécanisme de défense, car la dégradation diminue la menace des protéines oxydées formant des agrégats toxiques. De plus, les produits d'acides aminés libérés au cours du processus de dégradation, qui peuvent s'oxyder et y jouer le rôle de piègeurs des ERO, peuvent protéger les composants cellulaires vitaux de l'oxydation. Des mutations dans les gènes de la parkine et de l'ubiquitine carboxy-terminal hydrolase L1 (UCH-L1), qui sont liées à la MP, indiquent un rôle de la SUP dans la pathogenèse de la MP (figure 2.6). De plus, l' α -Syn, le composant clé des corps de Lewy, est un substrat de la SUP, tandis que l' α -Syn agrégée et endommagée par l'oxydation altère la fonction protéasomale. L'inhibition du C I altère également l'activité protéasomale par modification oxydative des composants du protéasome et augmentation des protéines endommagées par oxydation. Dans la SNpc des PcP, des preuves d'une SUP altérée ont été présentées avec des altérations structurelles du protéasome, y compris la perte de la sous-unité alpha, le composant qui régule et stabilise le protéasome [29].

2.2 Apoptose et Maladie de Parkinson

2.2.1 L'apoptose

L'apoptose (ou mort cellulaire programmée) est le processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal [30]. La notion d'apoptose a été introduite en 1972 par Kerr et ses collègues pour désigner une forme de mort cellulaire totalement différente de la nécrose [31]. Les cellules en cours d'apoptose présentent des caractéristiques morphologiques telles que la condensation du contenu cytoplasmique et nucléaire, le ressuyage des membranes plasmiques, la fragmentation des noyaux et finalement la décomposition en corps apoptotiques liés à la membrane et rapidement phagocytés [30]. La survie des cellules dépend de leur capacité à trouver dans leur environnement proche les signaux qui leur permettent de réprimer jour après jour le déclenchement de leur suicide. Ces signaux seront intégrés par la cellule qui en fonction de son génotype et de son état physiologique, orientera sa réponse vers la mort, la survie, la prolifération ou la différenciation cellulaire. La nature de l'apoptose peut être très variable aussi bien physiologique que pathologique ou intra- qu'extra-cellulaire [32].

2.2.2 La régulation de l'apoptose

L'apoptose peut être initié par deux voies alternatives : (i) voie extrinsèque : par les récepteurs de mort à la surface cellulaire, (ii) voie intrinsèque (mitochondriale). Ces deux voies sont complexes et font intervenir un réseau d'interactions protéiques incluant des récepteurs, des protéines régulatrices et des caspases. L'induction de l'apoptose conduit à l'activation des caspases initiateuses qui activeront à leur tour les caspases effectrices, ce qui constitue le point de non-retour pour la cellule [30].

La voie extrinsèque implique l'activation de la caspase-8 par les récepteurs (ex récepteur du TNF) avec l'activation ultérieure de l'effecteur caspase-3.

La voie intrinsèque s'effectue à travers la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Des facteurs apoptogènes mitochondriaux tels que le Cyt C, Smac/Diablo, l'endonucléase G ou le facteur induisant l'apoptose (AIF) sont libérés dans le cytosol. Une fois dans le cytosol, ces facteurs peuvent déclencher la mort cellulaire de manière dépendante ou indépendante de la caspase. Le Cyt C libéré interagit avec deux autres facteurs protéiques cytosoliques, Apaf-1 (facteur d'activation de la protéase apoptotique) et procaspase-9, pour activer la caspase-3 [33]. Smac/Diablo peut interagir avec plusieurs inhibiteurs de l'apoptose, soulageant ainsi l'effet inhibiteur des IAP (inhibiteurs de l'apoptose) sur les caspases initiateuses (par exemple, caspase-9) et effectrices (par exemple, caspase-3). L'AIF et l'endonucléase G peuvent se transloquer vers le noyau et induire une fragmentation de l'ADN indépendante de la caspase.

La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale est fortement régulée par des protéines anti-apoptotiques (par exemple, Bcl-2 et Bcl-xL) et pro-apoptotiques (par exemple, Bax et Bak) de la famille Bcl-2. Structurellement, toutes ces protéines partagent jusqu'à quatre domaines d'homologie Bcl-2 (BH1 – BH4). En plus des membres de la famille multi domaine Bcl-2, il existe des molécules qui partagent une homologie de séquence uniquement avec le domaine BH3 (comme Bid, Bim, Puma et Noxa) qui peuvent induire la mort cellulaire soit en activant des protéines pro-apoptotiques multi domaines, soit en inactivant des protéines anti-apoptotiques.

Bid est activé suite à son clivage par la caspase-8, reliant ainsi les voies extrinsèque et intrinsèque au niveau des mitochondries [16].

2.2.3 Apoptose et Maladie de Parkinson

L'apoptose est un mécanisme principal dans la MP qui résulte des processus inflammatoires et des troubles cellulaires décrits dans cette maladie ; lésions cellulaires consécutives à un stress oxydatif, accumulation du fer, insuffisance du C I, fonctionnement altéré des mitochondries, excitotoxicité, et autres [15, 34]. Par exemple, le fonctionnement altéré des mitochondries peut conduire à la production des ERO par la chaîne respiratoire, à la libération de Cyt C (à l'origine de l'activation de la voie intrinsèque apoptotique) et à la diminution de la production d'ATP (Figure 2.10) [35, 16]. Bien que les deux voies d'apoptose (extrinsèque et intrinsèque) soient impliquées dans la mort des neurones nigraux, la voie intrinsèque (mitochondriale) semble être la plus importante [36]. L'apoptose n'est pas le seul mécanisme par lequel les neurones DAergiques dégèrent [35, 16].

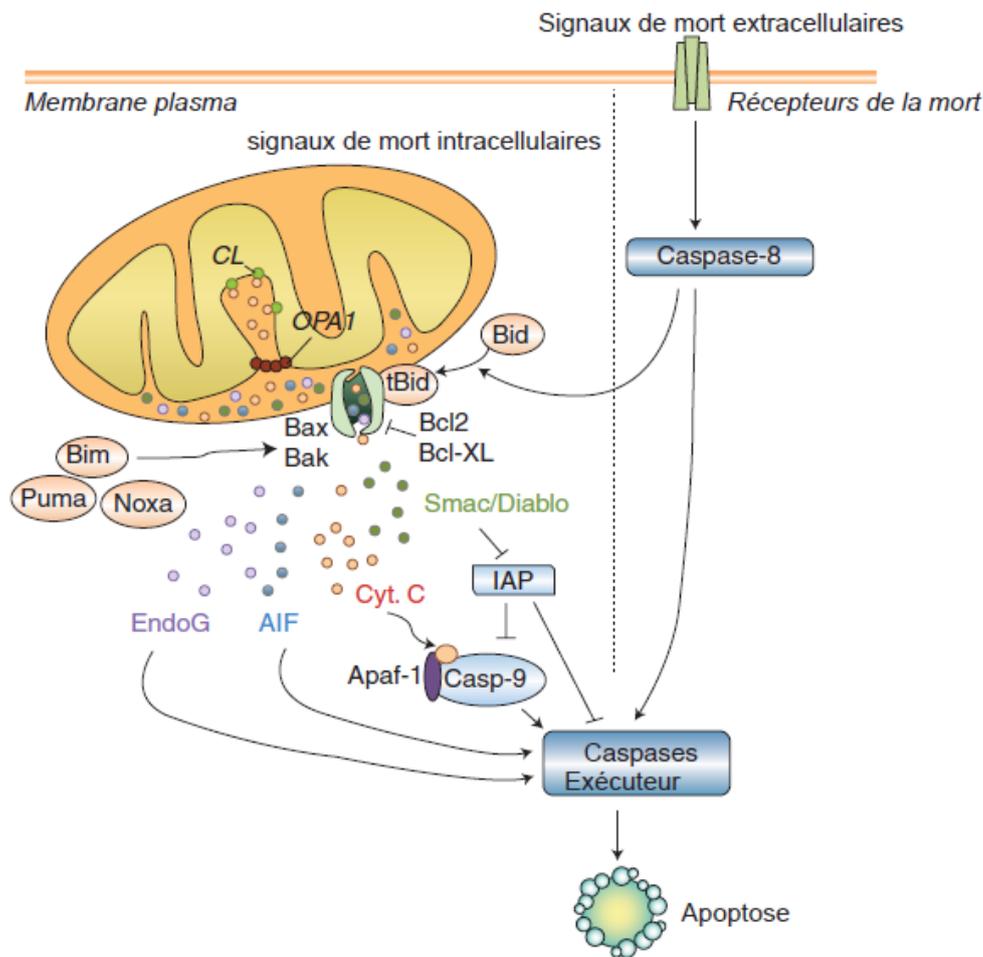


Figure 2.10: Transduction du signal de la mort cellulaire apoptotique. AIF: facteur induisant l'apoptose; Casp-9: caspase-9; CL: cardiolipine; OPA1: atrophie optique de type 1; Cyt. C: cytochrome C; EndoG: endonucléase G; IAP: inhibiteur de l'apoptose; tBid: tronquée Bid [16].

Références bibliographiques

- [1] Ghosh D, Mehra S, Sahay S, Singh PK, Maji SK. α -synuclein aggregation and its modulation. *Int J Biol Macromol*. 2017; 100:37-54. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.10.021
- [2] Ho PW, Ho JW, Liu HF, Zhang WY, Chu AC, Kwok KH, Ge X, Chan KH, Ramsden DB, Ho SL. Mitochondrial neuronal uncoupling proteins: a target for potential disease-modification in Parkinson's disease. *Transl Neurodegener*. 2012; 1(1):3.
- [3] Dexter DT, Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med*. 2013; 62:132-44.
- [4] Eguchi K, Taoufiq Z, Thorn-Seshold O, Trauner D, Hasegawa M, Takahashi T. Wild-Type Monomeric α -Synuclein Can Impair Vesicle Endocytosis and Synaptic Fidelity via Tubulin Polymerization at the Calyx of Held. *The Journal of Neuroscience*. 2017; 37(25):6043–6052.

- [5] Masato A, Plotegher N, Boassa D, Bubacco L. Impaired dopamine metabolism in Parkinson's disease pathogenesis. *Mol Neurodegeneration*. 2019; 14:35.
- [6] Branco DM. Cross-talk between mitochondria and proteasome in Parkinson's disease pathogenesis. *Front Aging Neurosci*. 2010. doi:10.3389/fnagi.2010.00017
- [7] Goldstein DS, Sullivan P, Holmes C, Miller GW, Alter S, Strong R, Mash DC, Kopin IJ, Sharabi Y. Determinants of buildup of the toxic dopamine metabolite DOPAL in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2013; 126(5):591-603.
- [8] Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat*. 2015; 9:91. doi:10.3389/fnana.2015.00091.
- [9] Sulzer D, and Zecca L. Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review. *Neurotox.Res*. 2000; 1:181–195.doi:10.1007/BF03033289).
- [10] Moreau C, Rolland AS, Guyon P. New neuroprotective strategy based on conservative iron chelation in Parkinson's disease. *Bull. Acad. Natl. Med*. 2019; 203(6):415-423.
- [11] Sian-Hulsmann J, Mandel S, Youdim MB, Riederer P. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2011; 118(6):939-57.
- [12] Song N, Xie J. Iron, Dopamine, and α -Synuclein Interactions in at-Risk Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease. *Neuroscience Bulletin*. 2018; 34:382-384.
- [13] Mochizuki H, Choong C, Baba K. Parkinson's disease and iron. *J Neural Transm*. 2020; 127:181–187. <https://doi.org/10.1007/s00702-020-02149-3>
- [14] Connolly NMC, Theurey P, Adam-Vizi V, Bazan NG, Bernardi P, Bolaños JP, Culmsee C, Dawson VL, Deshmukh M, Duchon MR, Düssmann H, Fiskum G, Galindo MF, Hardingham GE, Hardwick JM, Jekabsons MB, Jonas EA, Jordán J, Lipton SA, Manfredi G, Mattson MP, McLaughlin B, Methner A, Murphy AN, Murphy MP, Nicholls DG, Polster BM, Pozzan T, Rizzuto R, Satrustegui J, Slack RS, Swanson RA, Swerdlow RH, Will Y, Ying Z, Joselin A, Gioran A, Moreira Pinho C, Watters O, Salvucci M, Llorente-Folch I, Park DS, Bano D, Ankarcrona M, Pizzo P, Prehn JHM. Guidelines on experimental methods to assess mitochondrial dysfunction in cellular models of neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ*. 2018; 25:542–572.
- [15] Levy OA, Malagelada C, Greene LA. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis*. 2009; 14(4):478–500. doi:10.1007/s10495-008-0309-3
- [16] Perier C, Vila M. Mitochondrial biology and Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect Med*. 2012; 2, a009332.
- [17] Repetto MG, Domínguez RO, Marschoff ER. Free radicals, oxidative stress and oxidative damage in Parkinson's disease, *Mechanisms in Parkinson's Disease--Models and Treatments*, Dr. Juliana Dushanova (Ed.), 2012; ISBN: 978-953-307-876-2, InTech.

- [18] Subramaniam SR, Chesselet MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2013; 106-107:17-32.
- [19] Scorziello A, Borzacchiello D, Sisalli MJ, Di Martino R, Morelli M, Feliciello A. Mitochondrial Homeostasis and Signaling in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2020; 12:100. doi: 10.3389/fnagi.2020.00100. PMID: 32372945; PMCID: PMC7186467
- [20] Hwang O. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol.* 2013; 22(1):11-7.
- [21] Singh RP, Sharad S, Kapur S. Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: Relevance of Dietary Antioxidants. *JACM.* 2004; 5:218–225
- [22] Tsang AH, Chung KK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1792(7):643-50.
- [23] Chinta SJ, Andersen JK. Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1780(11):1362-7.
- [24] Gaeta A, Hider RC. The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy. *Br J Pharmacol.* 2005; 146(8):1041-59.
- [25] Hemmati-Dinarvand M, Saedi S, Valilo M, Kalantary-Charvadeh A, Alizadeh Sani M, Kargar R, Safari H, Samadi N. Oxidative stress and Parkinson's disease: conflict of oxidant-antioxidant systems. *Neuroscience Letters.* 2019; 134296.
- [26] Fiskum G, Starkov A, Polster Bm, Chinopoulos C. Mitochondrial Mechanisms of Neural Cell Death and Neuroprotective Interventions in Parkinson's Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006; 991(1):111–119.
- [27] Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br. J. Pharmacol.* 2011; 164(4):1357–1391. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01426.x
- [28] Rocha NP, de Miranda AS, Teixeira AL. Insights into Neuroinflammation in Parkinson's Disease: From Biomarkers to Anti-Inflammatory Based Therapies. *Biomed Res Int.* 2015; 1–12. doi:10.1155/2015/6281
- [29] Dias V, Junn E, Mouradian, MM. The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease'. *Parkinson's Dis.* 2013; 461 – 491.
- [30] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4):495-516.
- [31] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26:239-57.
- [32] Ameisen JC. La mort cellulaire programmée programme de mort ou programme de vie ? *Médecine/sciences.* 2002; 18(1):109 -110. doi:10.1051/medsci/2002181109

- [33] Kermer P, Liman J, Weishaupt JH, Bähr M. Neuronal apoptosis in neurodegenerative diseases: from basic research to clinical application. *Neurodegener Dis.* 2004; 1(1):9-19.
- [34] Lev N, Melamed E, Offen D. Apoptosis and Parkinson's disease. *Prog Neuro-Psychoph.* 2003; 27(2):245–250.
- [35] Singh S, Dikshit M. Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: Involvement of nitric oxide 2007; 233-50 p.
- [36] Hartmann A, Troadec JD, Hunot S, Kikly K, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Agid Y, Hirsch EC.. Caspase-8 is an effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, but pathway inhibition results in neuronal necrosis. *J Neurosci.* 2001; 21:2247–2255.

Chapitre 3 : Modèles animaux de la maladie de Parkinson

3.1 Modèles animaux de la maladie de Parkinson

Il existe essentiellement deux grandes catégories de modèles animaux utilisés pour étudier les mécanismes et le traitement de la MP: les modèles neurotoxiques et les modèles génétiques.

3.1.1 Modèles animaux neurotoxiques de la MP

Ces modèles représentent les modèles expérimentaux classiques et les plus anciens de la MP ; ils visent à reproduire les changements pathologiques et comportementaux de la maladie humaine chez les rongeurs ou les primates en utilisant des agents (neurotoxines) qui induisent la dégénérescence sélective des neurones nigrostriataux. Il existe quatre principaux modèles induits par les toxines populairement utilisés chez les rongeurs. Les neurotoxines utilisées sont : la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), le MPTP (1-méthyl-4-phényl-1, 2, 3, 6-tétrahydropyridine), le paraquat en association avec le Maneb, et la ROT [1, 2, 3]. Un certain nombre d'agents pharmacologiques et toxiques, notamment la réserpine, l'halopéridol et les inhibiteurs du protéasome tels que le PSI, la lactacystine et l'époximycine et les agents inflammatoires tels que les lipopolysaccharides (LPS) ont également été utilisés au fil des années pour modéliser la MP [1, 2].

On pense que le Maneb inhibe le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale, tandis que les autres toxines mitochondriales inhibent principalement le C I. Cette activité conduit à la génération des ERO ou à la réduction de la production d'ATP, ce qui conduit à l'apoptose et à la disparition des cellules.

Les LPS activent les microglies pour stimuler la libération de médiateurs inflammatoires, qui produisent à leur tour des ERA conduisant à la mort cellulaire.

L'inhibition de l'activité du protéasome permet une accumulation de protéines endommagées qui, par des dommages à l'ADN et d'autres processus, peuvent entraîner la mort cellulaire. La mort cellulaire est très probablement de nature apoptotique, bien que cela reste controversé pour certains agents (figure 3.1) [2].

La ROT a gagné une importance particulière parmi les neurotoxines, car elle pourrait aider à découvrir l'un des mécanismes responsables de la neurodégénérescence de la MP. Il a été suggéré que le modèle de MP utilisant la ROT chez les rongeurs offre plus d'avantages que les autres modèles, car il peut mimer avec succès la plupart des symptômes moteurs et les caractéristiques neuropathologiques de la maladie.

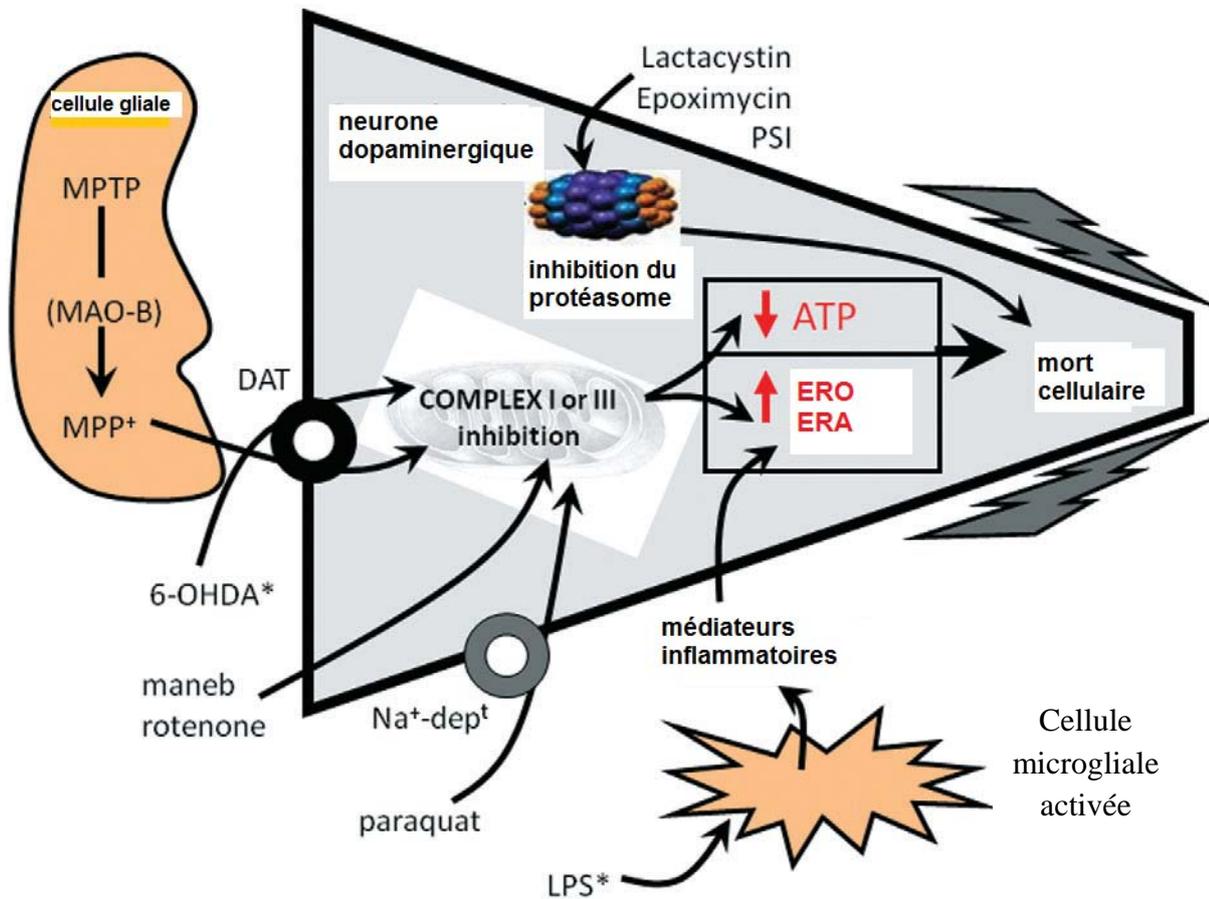


Figure 3.1: Représentation schématique d'un neurone DAergique de la SNpc montrant les cibles moléculaires des divers agents utilisés pour induire des modèles animaux de la MP qui présentent une dégénérescence des voies nigro-striatales. * Indique les agents qui sont administrés directement dans le cerveau ; tous les autres agents sont livrés par voie systémique [2]. MPTP: 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine; LPS: lipopolysaccharide; 6-OHDA: 6-hydroxydopamine; ERO: Espèce Réactive de l'Oxygène; ERA: Espèces Réactives de l'azote; DAT: transporteur membranaire de la DA; MAO-B: Mono amine oxydase B; Na⁺dep^t: canaux sodium dépendants.

3.1.2 Modèles génétiques de la MP

De nombreux modèles de souris transgéniques ont été développés afin de comprendre la pathogenèse de la MP et d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles. Les modèles génétiques sont ajustés en fonction des mutations génétiques identifiées dans la maladie humaine [2]. Parmi les différents modèles génétiques qui reproduisent les mutations les plus connues observées dans la MP familiale, le SNCA (α -Syn), le LRRK2, le PRKN, le PINK-1 et le DJ-1 (mutant transgénique) ont été générés chez la souris ou chez le rat (figure 3.2) [3]. Ces gènes font partie des voies de signalisation importantes pour la fonction DAergique neuronale. Ces modèles contribuent à la connaissance des mécanismes d'apparition ou de progression de la MP et à la compréhension de l'effet de ces mutations génétiques [4].

Des modèles alternatifs, qui récapitulent les mutations monogéniques observé chez les PcP, ont été développés dans des organismes non-mammifères, comme la drosophile, *Caenorhabditis elegans* et le poisson-zèbre (*Danio rerio*). D'autres modèles sont en cours de développement [3, 5].

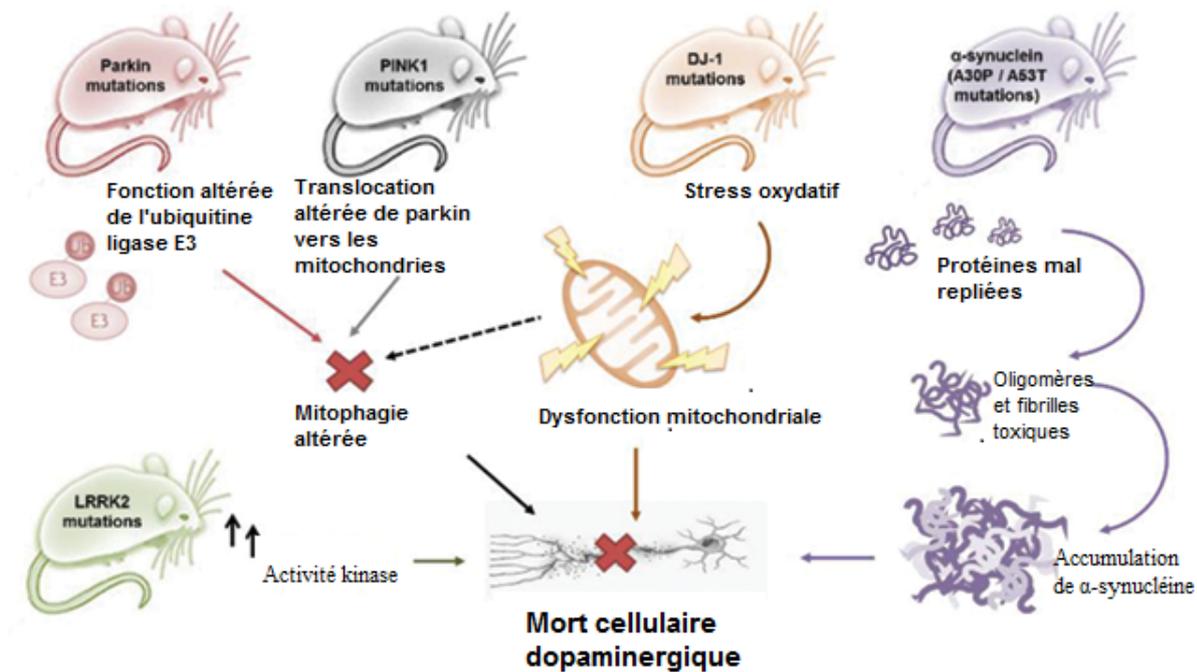


Figure 3.2 : Modèles transgéniques de la MP chez la souris [4].

3.2 La Roténone

3.2.1 Nature chimique de la molécule

La roténone (ROT) est une toxine naturelle qui se trouve dans les racines et les tiges de plusieurs espèces de plantes tropicales et subtropicales de la famille Leguminosae ; espèces du genre *Derris* ou *Lonchocarpus*. Par exemple, les extraits de racine de plante Cubé (*Lonchocarpus utilis*) ou Barbasco (*Lonchocarpus urucu*) sont enrichis en roténone [6, 7].

La ROT est utilisé comme un piscicide hautement sélectif pour le contrôle ou l'éradication des poissons non-indigènes dans les cours d'eau et des lacs. La ROT est également utilisé comme insecticide depuis le milieu des années 1800 [8, 9]. La ROT, est aussi utilisé comme un herbicide [10].

Le composant chimique actif a été isolé pour la première fois en 1895, à partir de la plante *Robinia nicou*, maintenant appelé *Lonchocarpus nicou*, par le botaniste français Emmanuel Geoffroy qui l'a appelé nicouline. En 1902, le chimiste japonais Nagai Nagayoshi a isolé un composé cristallin pur à partir de *Derris elliptica*. Il l'a appelé Roténone en s'inspirant du nom japonais de la plante, Roten.

En 1930, la structure chimique de la ROT a été déterminée, ce qui a permis de découvrir que la structure chimique de la nicouline et celle de la ROT sont identiques [8, 11].

Contrairement à de nombreux pesticides artificiels qui persistent dans l'environnement, la ROT est un produit instable qui s'oxyde rapidement en se transformant en déhydroroténone lorsqu'elle est exposée à l'air ou à la lumière [12]. Elle se décompose en cinq à six jours sous la lumière du soleil du printemps, ou en deux à trois jours sous la lumière du soleil de l'été [13].

Nom IUPAC de la ROT : **(2R,6aS,12aS)-1,2,6,6a,12,12a-hexahydro-2-isopropenyl-8,9-dimethoxychromeno[3,4-b]furo(2,3-h)chromen-6-one.**

Composition : 70.4 % carbone, 5.62 hydrogène %, 24.34 % oxygène.

Formule brute : C₂₃H₂₂O₆.

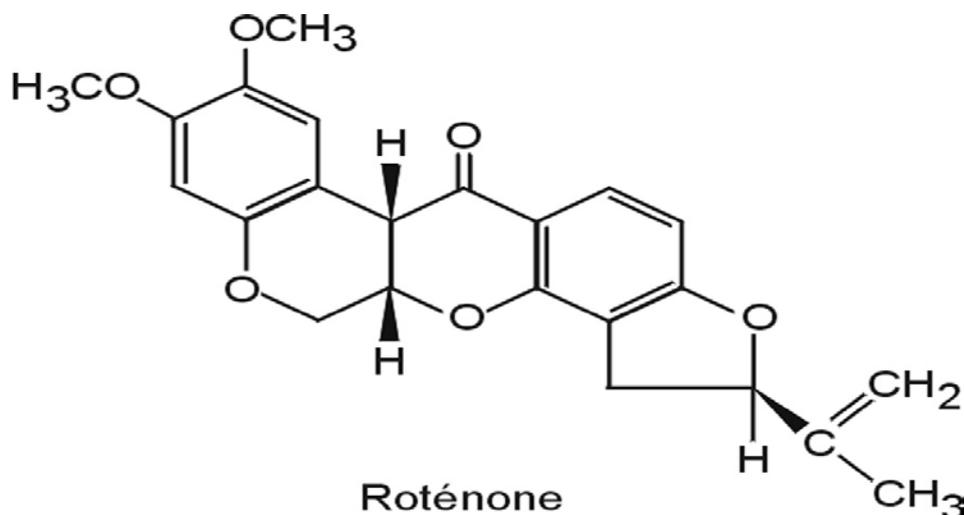


Figure 3.3 : Structure de la roténone [6].

3.2.2 Métabolisme et passage de la barrière hématoencéphalique

La ROT traverse facilement les membranes cellulaires en raison de sa structure lipophile, cette propriété explique pourquoi elle atteint facilement les cellules du SNC sans l'intervention d'un système de transport [10]. Elle pénètre dans toutes les cellules du corps et ne s'accumule pas sélectivement dans les neurones DAergiques [14], et se distribue dans toutes les organites, y compris les mitochondries à membrane double où elle inhibe le complexe de haute affinité I de la chaîne mitochondriale de transport des électrons [15].

La voie la plus courante d'exposition à la ROT chez l'homme est l'ingestion. Cependant, l'absorption dans l'estomac et les intestins est lente et incomplète, et le métabolisme dans le foie la décompose efficacement. Ces faits rendent improbable que des quantités significatives de ROT puissent entrer dans la circulation générale, à moins que d'énormes quantités ne soient ingérées [16].

L'analyse du métabolisme de la ROT montre que celle-ci est responsable des effets et non ses métabolites [17]. Plusieurs études antérieures ont examiné la toxicité de la ROT sur le système

nerveux humain, en particulier dans la pathogénèse de la MP [18, 19], mais peu d'entre elles ont étudié les effets de la ROT sur les reins et le foie et les autres organes [20, 21].

3.2.3 Toxicité

La roténone est toxique non seulement pour les insectes et les poissons, mais aussi pour les humains et les animaux. Chez les mammifères, la toxicité aiguë de la roténone est modérée et varie considérablement entre et au sein des espèces [22, 23]. L'OMS classe la roténone, avec la pyréthrine, un autre insecticide domestique biologique couramment utilisé, comme moyennement dangereux: il est classé au niveau 3 sur une échelle de 1 (le plus toxique) à 4 (le moins toxique)[8].

3.2.4 Mécanisme d'action de la neurotoxicité par la roténone

Sur la base de plusieurs études, il est devenu évident que l'effet toxique de la ROT est multifactoriel. La ROT peut exprimer sa toxicité par l'inhibition du C I, l'amélioration de la microglie activée, la modification de la signalisation du calcium, l'induction du stress oxydatif et de l'apoptose, la perte de tyrosine hydroxylase, le dysfonctionnement protéasomal, l'accumulation de fer nigral, la formation d'inclusions cytoplasmiques fibrillaires contenant de l'ubiquitine et de la synucléine, ou une combinaison de tous ces facteurs [24, 25, 26].

3.2.4.1 L'inhibition du complexe I

Depuis les années 1950, on pense que la ROT agit comme un inhibiteur de la mitochondrie [14]. La ROT a été utilisée pour modéliser la MP en 1985 lorsque Heikkila a injecté cet inhibiteur directement dans le cerveau [27]. L'inhibition mitochondriale du C I, pouvait induire la mort cellulaire dans diverses cellules [28]. En général, la ROT bloque le transfert d'électrons entre les groupes d'irosulfure associés au C I et le site de liaison à l'ubiquinone [29]. Plus précisément, la ROT agit comme un antagoniste de la semiquinone et déplace l'ubisemiquinone intermédiaire sur le site de liaison à l'ubiquinone [30]. En inhibant le site de liaison de l'ubiquinone, la ROT modifie l'état du C I, entraînant une production plus élevée de superoxyde sur le même site (figure 3.4) [31] et améliore ainsi la formation des ERO [32, 33]. La ROT active à la fois les caspases mitochondriales et endoplasmiques dépendantes du réticulum qui induisent l'apoptose [34]. Dans une étude précédente, ils ont trouvé que la toxicité induite par la ROT a été atténuée par les antioxydants [33].

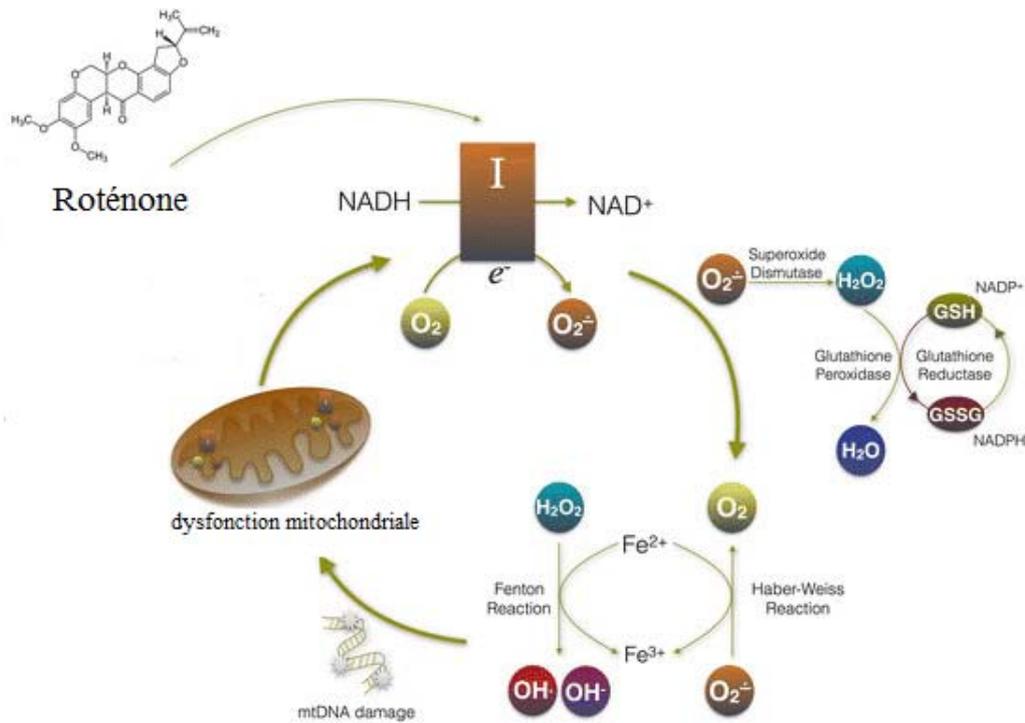


Figure 3.4: Production de superoxyde induite par la ROT et provocation d'un cycle d'auto-propagation du stress oxydatif.

3.2.4.2 La roténone et l'apoptose

La ROT augmente la concentration en ERO dans la matrice mitochondriale. L'augmentation des ERO active la voie intrinsèque apoptotique, qui augmente la perméabilité de la membrane externe via l'ouverture des pores de transition (figure 3.5) [35, 36]. Cela permet au Cyt C de se déplacer de l'espace inter-membranaire dans le cytoplasme des cellules, lui permettant de se lier à l'Apaf-1. En présence d'ATP, l'interaction Apaf-1/Cyt C change le procaspase-9 en caspase-9 qui à son tour clive la procaspase-3 en caspase-3. Les cellules contiennent des IAP pour prévenir l'activation accidentelle de la caspase-9. Le XIAP (La protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X) se lie à l'extrémité N-terminale activée de la caspase-9, la rendant inactive. Ce processus peut être inversé par les protéines mitochondriales Diablo/Smac et HtrA2/Omi libérées lors de l'apoptose, conduisant à l'activation de la caspase-3. La caspase-3 clive la sous-unité de 45 kDa d'une protéine à deux unités en produisant un facteur de fragmentation de l'ADN (DFF). L'augmentation du stress oxydatif peut également activer le facteur nucléaire kappa B (NF-κB) qui est impliqué au début d'un programme d'expression génique pro-apoptotique pouvant jouer un rôle dans les maladies neurodégénératives (figure 3.5) [37]. Une étude précédente confirme que la production des ERO mitochondriales induite par la ROT est étroitement liée à l'apoptose [28].

3.2.4.3 La roténone et l'excitotoxicité

Un mécanisme excitotoxique peut participer à la toxicité induite par la roténone dans les neurones DAergiques [38]. Étant un processus dépendant de l'énergie, le maintien du potentiel membranaire nécessite une efficacité mitochondriale normale. La roténone, un puissant inhibiteur du C I, peut augmenter le potentiel excitotoxique du glutamate en augmentant la vulnérabilité des neurones DAergiques même à de faibles concentrations du neurotransmetteur [38, 39].

3.2.4.4 La roténone et l'activation microgliale

La ROT a la capacité d'activer la microglie *in vivo* [40]. Cette activation provoque la libération du TNF- α , de l'interleukine 1 β (IL-1 β), et de l'interféron γ (IFN- γ) [12]. Ces cytokines peuvent se lier à leurs récepteurs et activer les voies de transduction, Ces cytokines peuvent se lier à leurs récepteurs respectifs et activer des voies de transduction, conduisant à l'activation de NF- κ B et finalement à l'apoptose (figure 4.6) [41, 37]. La production des ERO est une autre conséquence de l'activation de la microglie. Les ERO peuvent provenir de (i) la NADPH oxydase qui produit l'O₂⁻, (ii) la COX-2 (Cyclo-oxygénase-2) qui produit des radicaux libres en tant que sous-produits de la synthèse des prostaglandines, et (iii) l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS) qui génère du NO•. La réaction de l'O₂⁻ avec le NO• génère du peroxy-nitrite qui est fortement impliqué dans la pathogenèse de la MP [42, 43]. Il a été rapporté que le NF- κ B a été présent avant la caspase-3, ce qui permet de suggérer que les superoxydes et les cytokines, produites suite à l'activation de la microglie par la ROT, jouent un rôle dans l'activation du NF- κ B avant que l'inhibition du C I initie l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose [37].

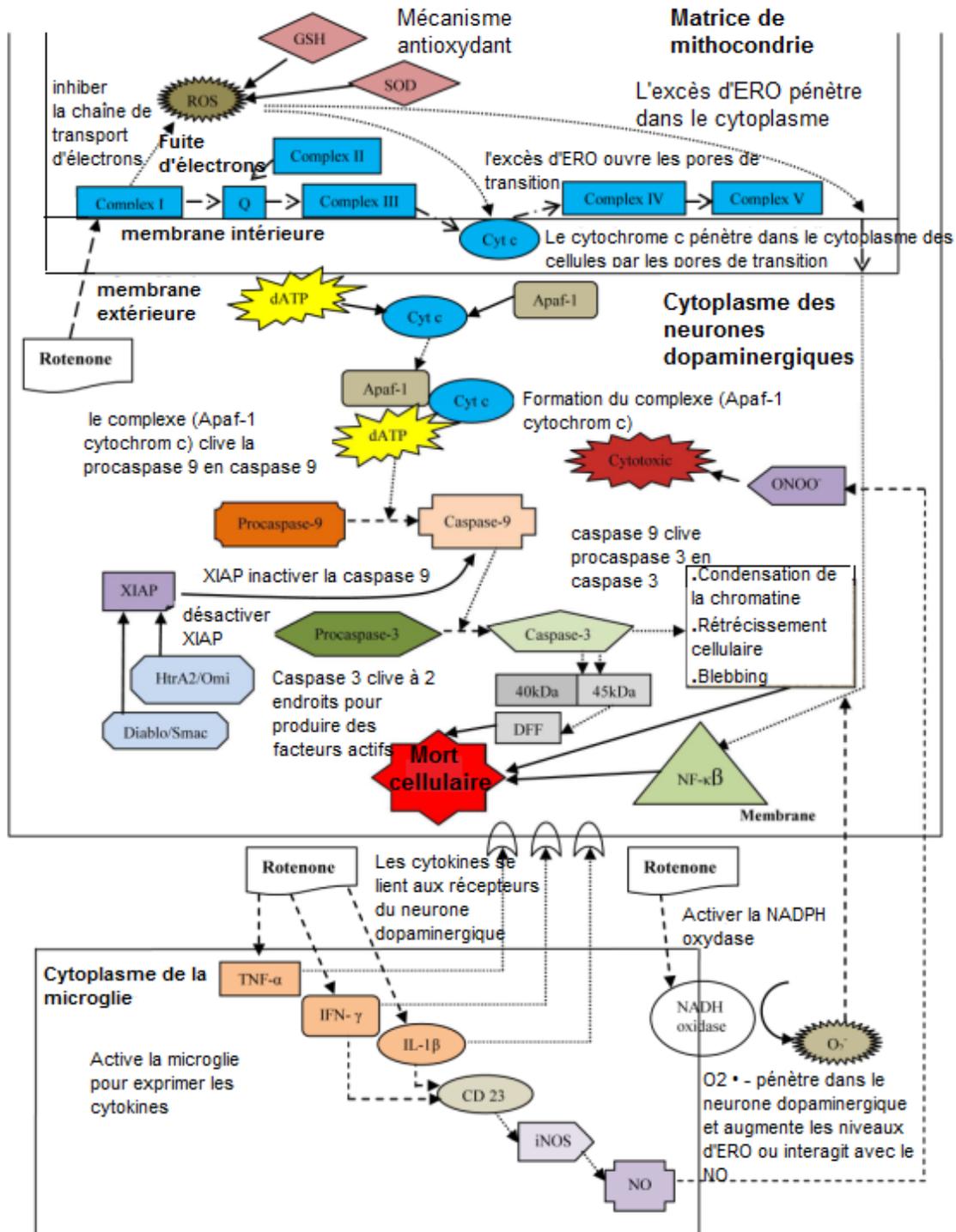


Figure 3.5: Mécanisme d'action de la roténone [37].

3.2.4.5 La roténone et l' α -synucléine

Le traitement par la ROT entraîne des inclusions intracytoplasmiques dans les neurones DAergiques imitant ainsi certains aspects de l'histopathologie de la MP [44]. Une analyse *in vitro* a révélé que la fibrillation de l' α -Syn est considérablement accélérée par plusieurs pesticides courants. La ROT étant l'un des agents les plus efficaces pour la formation de fibrilles [45, 46].

3.2.4.6 La roténone et la dopamine

La DA est impliquée dans la mort neuronale DAergique sélective induite par la roténone. La ROT inhibe principalement le transporteur VMAT2 et active ensuite la libération de la DA et sa redistribution du pool vésiculaire vers la fente synaptique et le cytosol [47], ce qui peut expliquer la toxicité de la ROT [48]. La roténone augmente les niveaux intracellulaires du métabolite toxique de la DOPAL via la diminution du métabolisme DOPAL par l'ALDH (figure 3.6) [49]. Il a été également suggéré que la ROT peut inhiber l'enzyme TH, qui est l'enzyme limitant la vitesse de la synthèse de la DA [50].

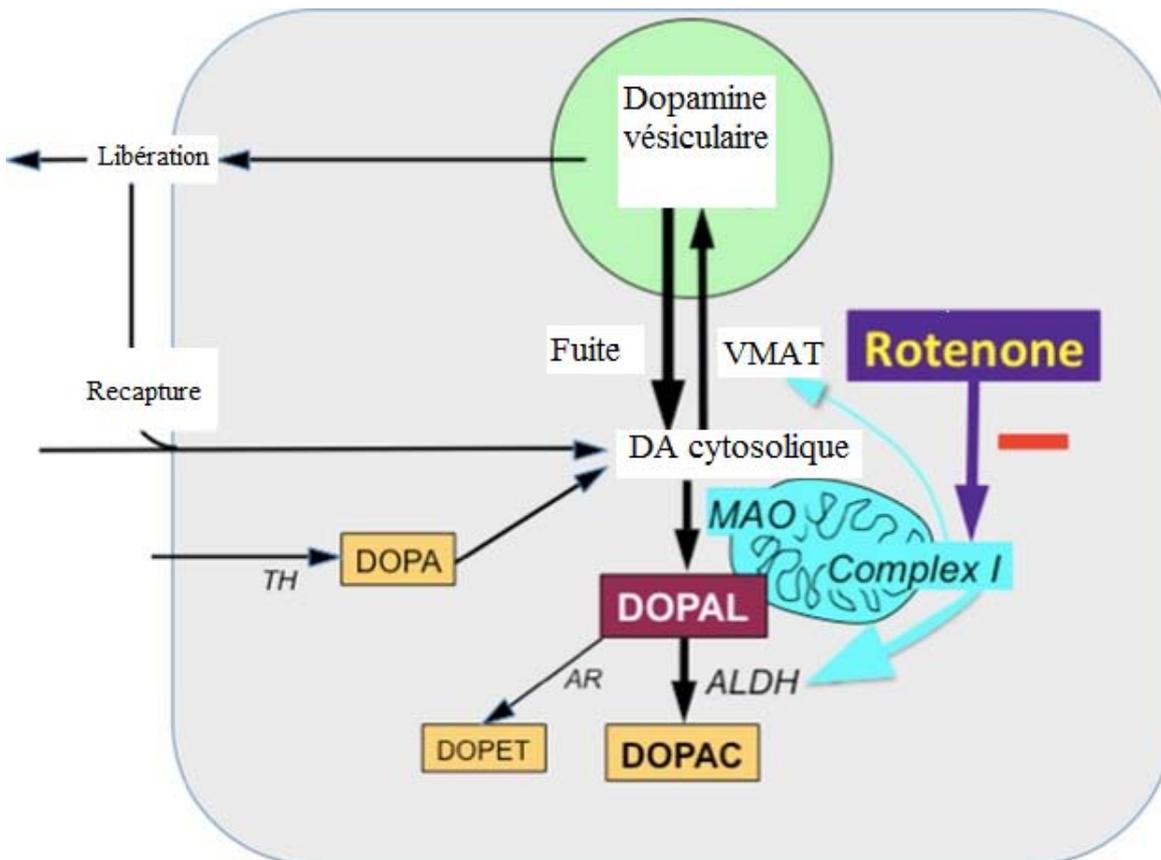


Figure 3.6: Mécanisme d'accumulation intracellulaire de la DOPAL induite par la roténone [49].

MAO: monoamine oxydase; DOPAL: 3,4-dihydroxyphényl-acétaldéhyde; ALDH: l'aldéhyde déshydrogénase; VMAT: transporteur vésiculaire monoamine; TH: Tyrosine Hydroxylase; DOPAC: l'acide dihydroxyphénylacétique; DOPET: 3,4-dihydroxyph-énylethanol; AR: aldehyde/aldose reductase.

3.2.4.7 La roténone et l'accumulation de fer nigral

Le traitement par la roténone provoque des lésions mitochondriales et une accumulation de fer dans les neurones DAergiques de la substance noire. L'accumulation du fer aggrave les dommages mitochondriaux. En même temps, une surcharge en fer entraîne une accumulation d' α -Syn [51].

Références bibliographiques

- [1] Blesa J, Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat.* 2014; 8:155.
- [2] Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol.* 2011; 164(4):1357-1391.
- [3] Le W, Sayana P, Jankovic J. Animal models of Parkinson's disease: a gateway to therapeutics? *Neurotherapeutics.* 2014; 11, 92–110.
- [4] Javier Blesa, Ines Trigo-Damas, Ana Quiroga-Varela, Lopez-Gonzalez N. Animal Models of Parkinson's Disease, *Challenges in Parkinson's Disease*, Edited by Jolanta Dorszewska and Wojciech Kozubski, IntechOpen, 2016; DOI: 10.5772/63328.
- [5] Blandini F, Armentero MT. Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J.* 2012; 279(7):1156-66.
- [6] Duke SO, Cantrell CL, Meepagala KM, Wedge DE, Tabanca N, Schrader KK. Natural toxins for use in pest management. *Toxins (Basel).* 2010; 2(8):1943-62.
- [7] Wood DM, Alshahaf H, Streete P, Dargan PI, Jones AL. Fatality after deliberate ingestion of the pesticide rotenone: a case report. *Crit Care.* 2005; 9(3):R280-R284. doi:10.1186/cc3528
- [8] Robertson DR, Smith-Vaniz WF. Rotenone: An Essential but Demonized Tool for Assessing Marine Fish Diversity. 2008.
- [9] Ott KC. Rotenone. A brief review of its chemistry, environmental fate, and the toxicity of rotenone formulations. 2015.
- [10] Erbas O, Oltulu F, Taskiran D. Amelioration of rotenone-induced dopaminergic cell death in the striatum by oxytocin treatment. *Peptides.* 2012; 38(2):312-7.
- [11] La Forge FB, Haller HL, Smith LE. The Determination of the Structure of Rotenone. *Chemical Reviews.* 1933; 12(2), 181–213.
- [12] Couteaux A, Le jeune V, Index phytosanitaire ACTA 2004. ACTA, 40e Edition, Paris. 804p.
- [13] Testa CM, Sherer TB, Greenamyre JT. Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005; 134(1):109-18.
- [14] Alam M. Controversies on new animal models of Parkinson's disease pro and con: the rotenone model of Parkinson's disease (PD). *J. Neural Transm. Suppl.* 2006; (70):273-6.
- [15] Kotake Y, Ohta S. MPP+ analogs acting on mitochondria and inducing neuro-degeneration. *Current Medicinal Chemistry.* 2003; 10:2507-16.
- [16] Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx.* 2005; 2(3):484–494. doi:10.1602/neurorx.2.3.484.

- [17] Caboni P, Sherer Tb, Zhang N, Taylor G, Na HM, Greenamyre JT, Casida JE. Rotenone, deguelin, their metabolites, and the rat model of Parkinson's disease. *Chem Res Toxicol*. 2004; 17:1540-1548.
- [28] Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*. 2000; 3(12):1301–1306. doi: 10.1038/81834.
- [19] Alam M, Mayerhofer A, Schmidt WJ. The neurobehavioral changes induced by bilateral rotenone lesion in medial forebrain bundle of rats are reversed by L-DOPA. *Behav Brain Res*. 2004; 151(1-2):117–124.
- [20] Jiang XW, Qiao L, Feng XX, Liu L, Wei QW, Wang XW, Yu WH. Rotenone induces nephrotoxicity in rats: oxidative damage and apoptosis. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2017; 27(7):528-536. DOI: 10.1080/15376516.2017.1333553.
- [21] Siddiqui MA, Ahmad J, Farshori NN, Saquib Q, Jahan S, Kashyap MP, Ahamed M, Musarrat J, Al-Khedhairi AA.. Rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in human liver HepG2 cells. *Mol Cell Biochem*. 2013; 384(1–2):59–69.
- [22] Wrangel C, Schwabe K, John N, Krauss JK, Alam M. The rotenone-induced rat model of Parkinson's disease: Behavioral and electrophysiological findings. *Behav Brain Res*. 2016; 279, 52–61. doi:10.1016/j.bbr.2014.11.002
- [23] Uversky V. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: Understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodégénération. *Cell Tissue Res*. 2004; 318:225–241.
- [24] Gupta RC. Rotenone. *Encyclopedia of Toxicology*. 2014; 4:185–187.
- [25] Ling N. Rotenone – a review of its toxicity and use for fisheries management. *Trop Conserv Sci*. 2002; 211:40
- [26] INSERM. Pesticides. Effets sur la santé. Collection expertise collective, Mécanismes d'action neurotoxique des pesticide. Chapitre 23, 765-830. Inserm, Paris, 2013.
- [27] Heikkila RE, Nicklas WJ, Vyas I. Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine toxicity. *Neurosci Lett* 1985; 62:389–394.
- [28] Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem*. 2003; 278(10):8516-25.
- [29] Grivennikova VG, Maklashina EO, Gavrikova EV, Vinogradov AD. Interaction of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase with rotenone as related to the enzyme active/inactive transition. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1319(2–3):223–232.

- [30] Degli Esposti M. Inhibitors of NADH–ubiquinone reductase: an overview. *Bioch. Biophys. Acta.* 1998; 1364:222–235.
- [31] Lori M. Buhlman, *Mitochondrial Mechanisms of Degeneration and Repair in Parkinson's Disease*. chapter: Toxin-Mediated Complex I Inhibition and Parkinson's Disease. Year: 2016; Pages 115-137. Publisher: Springer International Publishing,
- [32] Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)_oxidation-reduction state. *Biochem J.* 2002; 368:545–553.
- [33] Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Greenamyre JT. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 2003; 23:10756–10764.
- [34] Chung WG, Miranda CL, Maier CS. Epigallocatechin gallate (EGCG) potentiates the cytotoxicity of rotenone in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain research.* 2007; 1176:133–142.
- [35] Fiskum G, Starkov A, Polster BM, Chinopoulos C. Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 991:111-119.
- [36] Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol. Paris.* 2003; 552(Pt 2):335–344.
- [37] Anwar Norazit, George Mellick, Adrian C. B. Meedeniya (2012). *Oxidative Stress in Parkinson's Disease; Parallels Between Current Animal Models, Human Studies and Cells, Oxidative Stress and Diseases*, Dr. Volodymyr Lushchak (Ed.), ISBN: 978-953-51-0552-7, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-diseases/oxidative-stress-in-parkinson-s-diseaseparallels-between-current-animal-models-human-studies-a>.
- [38] Wu YN, Johnson SW. Rotenone reduces Mg²⁺-dependent block of NMDA currents in substantia nigra dopamine neurons. *Neurotoxicology.* 2009; 30:320–325.
- [39] Ambrosi G, Cerri S, Blandini F. A further update on the role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 2014; 121:849–859.
- [40] Sherer TB, Betarbet R, Kim JH, Greenamyre JT. Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2003; 341:87-90.
- [41] Wang X, Qin ZH, Leng Y, Wang Y, Jin X, Chase TN, Bennett MC. Prostaglandin A1 inhibits rotenone-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* 2002; 83:1094-102.
- [32] Beal MF. Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 991:120–131.

- [43] Madathil KS, Karuppagounder SS, Haobam R, Varghese M, Rajamma U, Mohanakumar KP. Nitric oxide synthase inhibitors protect against rotenone-induced, oxidative stress mediated parkinsonism in rats. *Neurochem. Int.* 2013; 62:674–683.
- [44] Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012:845618.
- [45] Uversky VN, Li J, Fink AL. Pesticides directly accelerate the rate of alpha-synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease. *FEBS Lett.* 2001; 500:105–108.
- [46] Uversky VN, Li J, Bower K, Fink AL. Synergistic effects of pesticides and metals on the fibrillation of α -synuclein: implications for Parkinson's disease. *Neurotoxicology.* 2002; 23:527–536.
- [47] Qi Z, Miller GW, Voit EO. Rotenone and paraquat perturb dopamine metabolism: a computational analysis of pesticide toxicity. *Toxicology.* 2014; 315:92–101.
- [48] Sakka N, Sawada H, Izumi Y, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, Shimohama S, Akaike A. Dopamine is involved in selectivity of dopaminergic neuronal death by rotenone. *NeuroReport.* 2003; 14:2425–2428.
- [49] Goldstein DS, Sullivan P, Cooney A, Jinsmaa Y, Kopin IJ, Sharabi Y. Rotenone decreases intracellular aldehyde dehydrogenase activity: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 2015; 133(1):14–25. doi:10.1111/jnc.13042
- [50] Hirata Y, Nagatsu T. Rotenone and CCCP inhibit tyrosine hydroxylation in rat striatal tissue slices. *Toxicology.* 2005; 216:9–14.
- [51] Tuo Liang, Zhong-Ming Qian, Ming-Dao Mu. Brain Hecpidin Suppresses Major Pathologies in Experimental Parkinsonism. 2020; 23(7), 101284.

Chapitre 4 : Thérapies de la maladie de parkinson

4.1 Traitements médicamenteux

Il n'existe pas actuellement de traitement curatif de la MP. Les objectifs thérapeutiques actuels sont de contrôler les symptômes de la MP, de prévenir les complications motrices et d'atténuer leurs conséquences sur la vie personnelle et sociale de la PcP. Ces traitements pallient l'insuffisance de la DA en administrant son précurseur (L-Dopa), en fournissant un agoniste de la DA, ou en inhibant la dégradation de la DA (Figure 4.1) [1, 2, 3].

4.1.1. Les médicaments dopaminergiques « L-dopa »

Après la découverte de la L-dopa à la fin des années 1960, l'objectif principal des traitements pharmacologiques est devenu la restauration du tonus DAergique. L'utilisation de la Levodopa (L-Dopa) comme traitement de substitution de la DA est fortement efficace dans l'amélioration des symptômes de la maladie. Il s'agit d'un précurseur de la DA qui, contrairement à cette dernière, est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE).

L'administration concomitante d'autres médicaments peut améliorer l'efficacité de la L-Dopa à travers l'inhibition de sa conversion en DA en dehors du SNC, limitant ainsi les effets secondaires systémiques. Les inhibiteurs périphériques de la DDC (IDDP) comme la carbidopa et le benserazide sont associés à la L-Dopa pour empêcher sa transformation en DA au niveau périphérique. Par ailleurs, les IDDP sont incapables de traverser la BHE et ne nuisent donc pas à la production de DA dans le cerveau (Figure 4.1) [2].

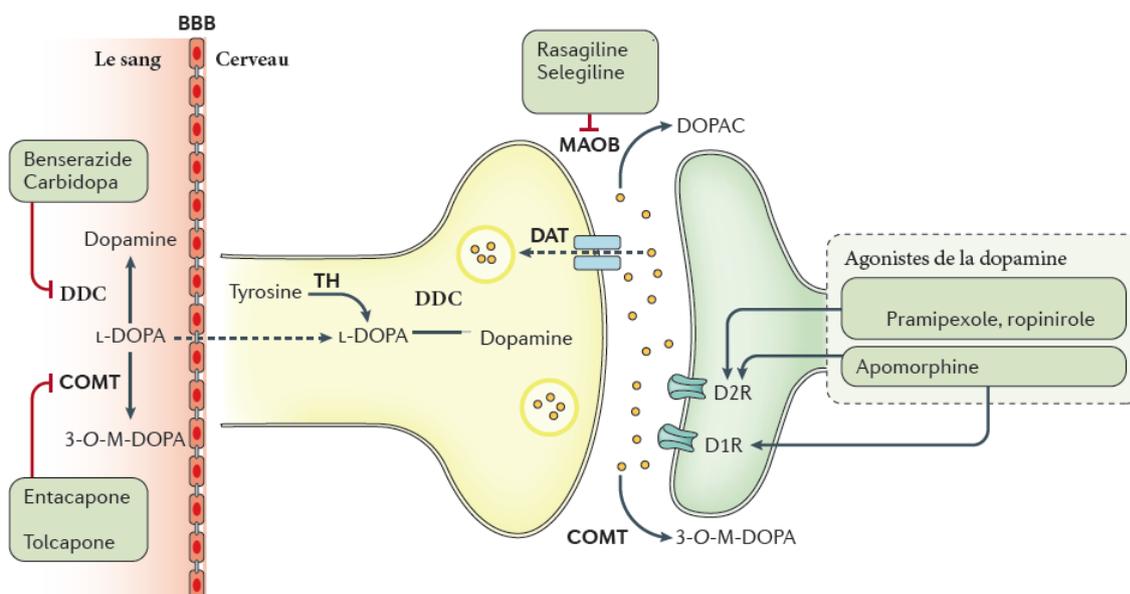


Figure 4.1 : Cibles médicamenteuses DAergiques dans la MP.

DDC : Dopa-décarboxylase; COMT: Catéchol-O-méthyl transférase; MAO-B: MAO de type B; DA: dopamine.

Presque tous les PcP présentent une réponse positive à la L-Dopa et présentent moins d'incapacités, une qualité de vie améliorée, une employabilité prolongée et un taux de mortalité réduit. Cependant, un traitement chronique par la L-Dopa est associé à l'apparition de complications motrices (fluctuations motrices et dyskinésies) dans la majorité des cas ; environ 50 à 80% des PcP ayant reçu de la L-dopa, pendant 5 à 10 ans, ont développé ces complications [4]. La cause précise des complications motrices n'est pas encore connue, mais de plus en plus d'éléments suggèrent qu'ils sont liés à une stimulation pulsatile anormale des récepteurs de la DA. La L-Dopa peut générer des ERO cytotoxiques par le biais du métabolisme oxydant de la DA ou par auto-oxydation. Cela a conduit à des préoccupations théoriques selon lesquelles la L-dopa pourrait être toxique pour les neurones DAergiques et pourrait accélérer le taux de dégénérescence des neurones nigraux dans la MP. En effet, la L-Dopa peut être toxique pour les neurones DAergiques en culture cellulaire (*in vitro*). Cependant, il existe peu ou pas de preuves dans les modèles *in vivo* suggérant que le traitement par la L-Dopa endommage les neurones nigraux [5].

4.1.2 Agonistes dopaminergiques

Les agonistes de la DA exercent leurs effets antiparkinsoniens en agissant directement sur les récepteurs de la DA et en imitant le neurotransmetteur endogène. Il existe deux sous-classes d'agonistes de la DA : les agonistes ergoline (bromocriptine, pergolide, lisuride et cabergoline) et non-ergoline (ropinirole et pramipexole). Ces deux sous-classes ciblent les récepteurs de type D2. L'apomorphine, l'un des premiers médicaments qui améliore les symptômes de la MP, est un agoniste non-ergoline combiné qui cible les récepteurs D1 et D2 (Figure 4.1) [6, 3].

4.1.3 Les inhibiteurs du catabolisme de la dopamine

Au niveau physiologique, la DA est métabolisée par des enzymes spécifiques. Afin d'augmenter la concentration disponible de la DA, des traitements se basent sur le blocage de certaines enzymes (MAO et COMT) afin de limiter sa dégradation et prolonger l'effet thérapeutique de la DA en améliorant sa biodisponibilité [7].

Les inhibiteurs de Catécol-O-Méthyl transférase « ICOMT »

Les inhibiteurs de la COMT, entacapone et tolcapone, sont des inhibiteurs compétitifs sélectifs de la Catécol-O-Méthyl transférase. L'entacapone ne traverse pas la BHE, tandis que la tolcapone la traverse bien, agissant donc dans le ST au niveau présynaptique. Leur objectif est d'augmenter la biodisponibilité de la DA et sa demi-vie plasmatique [2, 3].

Les inhibiteurs de la mono amine oxydase B : IMAO-B

Les effets DAergiques peuvent être améliorés avec les IMAO-B à action centrale. La sélégiline et la rasagiline retardent la dégradation de la DA générée par la L-Dopa dans le SNC [3].

4.1.4 Traitement chirurgical

Réservé aux patients dont la qualité de vie est altérée du fait de l'échec de contrôle de l'état moteur par les médicaments, la chirurgie (stimulation cérébrale profonde) est employée pour réduire les dyskinésies et les dystonies.

Références bibliographiques

- [1] Muthuraman M, Koirala N, Ciolac D, Pinteá B, Glaser M, Groppa S, Tamás G, Groppa S.. Deep Brain Stimulation and L-DOPA Therapy: Concepts of Action and Clinical Applications in Parkinson's Disease. *Front. Neurol.* 2018; 9.
- [2] Olanow CW, Watts RL, Koller WC. An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease (2001): treatment guidelines. *Neurology.* 2001; 56:S1-S88.
- [3] Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, Schrag AE, Lang AE.. Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2017; 3:17013.
- [4] Lewitt PA. Levodopa for the treatment of Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 2008; 359:2468–76.
- [5] Olanow, C. Levodopa/dopamine replacement strategies in Parkinson's disease: Future directions. *Mov Disord.* 2008; 23:S613–S622
- [6] Olanow CW, Agid Y, Mizuno Y, Albanese A, Bonuccelli U, Damier P, De Yebenes J, Gershanik O, Guttman M, Grandas F, Hallett M, Hornykiewicz O, Jenner P, Katzenschlager R, Langston WJ, LeWitt P, Melamed E, Mena MA, Michel PP, Mytilineou C, Obeso JA, Poewe W, Quinn N, Raisman-Vozari R, Rajput AH, Rascol O, Sampaio C, Stocchi F. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current controversies. *Mov Disord.* 2004; 19(9):997-1005.
- [7] Brooks DJ. Dopamine agonists: their role in the treatment of Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2000; 68:685-689.

Chapitre 5 : Maladie de parkinson et Produits naturels

5.1 Plantes avec des activités antiparkinsoniennes

Ces dernières années, un intérêt croissant a été porté au traitement ou à la prévention de la MP par des médicaments à base de plantes. Des études récentes ont montré que certains extraits, composés actifs et formulations à base de plantes médicinales ont des effets sur les modèles *in vitro* et *in vivo* de la MP [1, 2]. On peut citer comme exemple le thé vert qui est dérivé des feuilles de *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (Theaceae). Une étude récente a indiqué que la consommation de thé peut réduire le risque de MP [3]. Les résultats d'une étude antérieure ont montré également que la thérapie par les plantes médicinales peut efficacement améliorer les symptômes moteurs et les symptômes non moteurs de la MP, et que ces plantes sont bien tolérées par les PcP [4]. Un grand nombre de plantes ont été rapportées pour leur action efficace dans la prévention et le traitement du parkinsonisme. La plupart des littératures ont été focalisées sur les herbes antioxydantes, neuroprotectrices, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques telles que : *Acanthopanax senticosus* Harms ; *Withania somnifera* ; *Uncaria rhynchophylla* ; *Nardostachys jatamansi* ; *Chrysanthemum morifolium* ;

Cassiae semen ; *Anemopaegma mirandu* ; *Hypericum perforatum* ; *Gastrodia elata* Blume ; *Centella asiatica* ; *Thuja orientalis* ; *Mucuna pruriens* ; *Ginkgo biloba* ; *Plumbago scandens* ; *Bacopa monniera* ; *Chrysanthemum morifolium* (famille : Asteraceae) ; *Carthamus tinctorius* L (famille : Asteraceae) et diverses autres plantes. De nombreux constituants sont présents dans ces plantes utilisées contre le parkinsonisme : la L-DOPA (ex : *Mucuna pruriens*), les flavonoïdes, les alcaloïdes, et autres polyphénols [5, 6].

5.2 Description de la famille des astéracées

Les Asteraceae ou Compositae constituent une famille extrêmement large et très répandue de plantes à fleurs. Cette famille comprend près de 25000 espèces connues à travers le monde [7]. En Algérie, elle est représentée par 109 genres et plus de 408 espèces [8]. Ces espèces sont utilisées globalement dans l'alimentation humaine, la production d'huile, l'usage médical etc.

5.3 Description du genre *Centaurea*

Le genre *Centaurea* (tribu Cynareae) de la famille des astéracées est l'un des genres les plus répandus dans le monde. Il compte environ 700 espèces. Ce genre est présent en Algérie en majorité dans l'est et le sud-est, il est représenté par 45 espèces dont 7 espèces sont sahariennes localisées au sud [9]. Il est répandu aussi bien en Europe méridionale, dans le bassin méditerranéen, à l'ouest de l'Asie et sur le continent américain [8]. Les *Centaurees* sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces, à feuilles alternées. Comme pour toutes les composées, les fleurs ou

fleurs sont disposées en capitule et entourées d'un involucre. Leur couleur varie le plus souvent entre le rose et le violet, mais il existe aussi quelques espèces à fleurs jaunes. L'involucre est composé de bractées inégales sur plusieurs rangs au style des artichauts. Ces bractées peuvent être ciliées (le cas le plus fréquent) ou épineuses [8].

5.3.1 Les propriétés biologiques et pharmacologiques des Centaurées

Plusieurs espèces de ce genre sont reconnues comme ayant des vertus médicinales. Les espèces de ce genre sont utilisées dans la médecine traditionnelle dans le monde entier, notamment pour traiter les maladies endocriniennes (diabète), les troubles inflammatoires (douleurs rhumatismales...), les états fébriles, les symptômes gastro-intestinaux, les problèmes cardiovasculaires, les infections parasitaires et microbiennes et les affections urogénitales [10]. Plusieurs études scientifiques ont mis en évidence diverses propriétés biologiques et pharmacologiques du genre *Centaurea*, telles que l'activité analgésique [11], cytotoxique [12], antibactérienne [13], antifongique [14] et antioxydante [15].

Plusieurs espèces sont connues par leur richesse en métabolites secondaires et leurs usages médicaux : *C. calcitrapa* est utilisée comme un fébrifuge ; *C. jacea* est utilisée pour soulager la constipation, augmenter l'appétit, réduire la fièvre et traiter les troubles menstruels ; *C. furfuracea*, espèce endémique des régions désertiques du nord de l'Afrique, est utilisée en Tunisie comme astringent et diurétique ; *C. incana* dont les racines sont employées dans le secteur des Aurès de l'Algérie pour le traitement des affections hépatiques [16] ; *C. cyanus* fait partie des plantes médicinales qui présentent un large éventail d'effets sur le SNC [17, 18] ; *C. behen* Linn est l'un des constituants de Majun Khadar, une formulation neuroprotectrice à base de plantes qui contient 27 constituants [19].

5.3.2 Données phytochimique du genre *Centaurea*

Les études phytochimiques effectuées sur les espèces du genre *Centaurea* ont mis en évidence la présence des principales classes des métabolites secondaires y compris les triterpènes, les composés phénoliques notamment les flavonoïdes, les lignanes et les lactones sesquiterpéniques [20], les stéroïdes [21] et les alcaloïdes [22].

5.3.2.1 Les composés phénoliques

L'expression de « composés phénoliques » est utilisée pour définir les substances chimiques qui possèdent au moins un groupement hydroxyle (OH) substitué sur un cycle aromatique. Leur nom provient du composé parent le plus simple ; le phénol [24]. Les polyphénols sont des composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton [25, 26]. Ils sont

subdivisés en groupes selon le nombre d'anneaux phénoliques et les éléments structuraux qui lient ces anneaux (figure 5.1). Ils sont localisés dans différentes parties des plantes [27].

Les composés phénoliques sont connus pour leurs activités anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériennes, antivirales, anticancéreuses, anti-allergiques et vasodilatatrices [28]. L'activité antioxydante des composés phénoliques est principalement attribuable à leurs propriétés redox, qui leur permettent d'agir comme agents réducteurs et donneurs d'hydrogène [29].

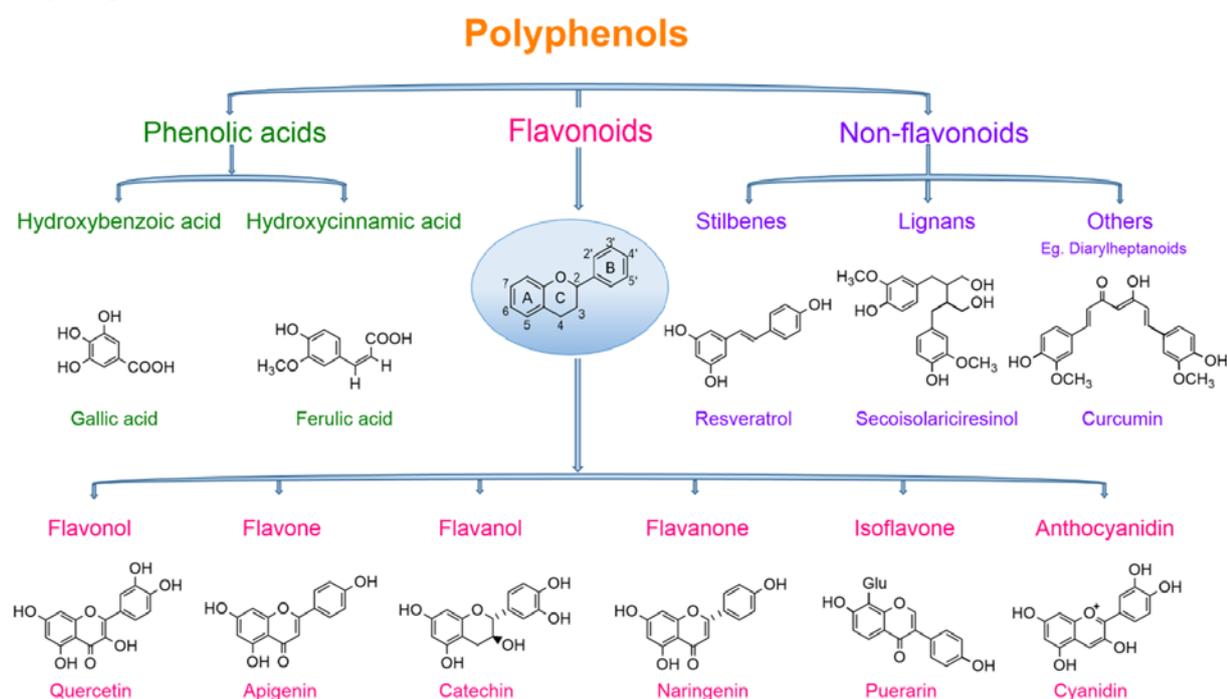


Figure 5.1: Classification des polyphénols [30].

Parmi les classes de molécules phénoliques qui nous intéressent :

5.3.2.2 Les flavonoïdes

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Les flavonoïdes ont des structures chimiques variées et des caractéristiques spécifiques. Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques, dans la régulation des gènes et dans le métabolisme de croissance [31]. Structuellement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones, les anthocyanes et les tanins. Ces diverses substances existent à la fois sous forme libre et sous forme de glycosides. On les trouve, d'une façon générale, dans toutes les plantes vasculaires où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs, fruits, et aussi dans le miel [32, 33].

La classe des flavonoïdes est l'une des plus abondantes et à ce jour, plus de 9000 structures naturelles ont été isolées et caractérisées. Ces composés sont réputés pour leur caractère anti-oxydant, neutralisant les radicaux libres et limitant ainsi certains dommages oxydatifs responsables de certaines maladies. Ils sont donc à l'origine d'effets physiologiques bénéfiques pour l'organisme humain et méritent l'intérêt croissant que la recherche leur porte [34].

De nombreux travaux indiquent que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires [35] et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire [36]. Ils ont aussi des propriétés antivirales [37], antibactériennes [38], anti-cancérigènes [39] et antioxydantes avec un impact sur la peroxydation lipidique. Ils peuvent également interférer avec le métabolisme des xénobiotiques [40] en stimulant les systèmes de détoxification [41]. Les flavonoïdes sont susceptibles de réagir avec la plupart des ERO [42, 43].

5.3.3 L'espèce *Centaurea africana*

Notre choix pour cette espèce se justifie par le fait qu'elle est endémique d'une part et parce qu'elle est très riche en métabolites secondaires, notamment les composés phénoliques présentant diverses activités biologiques, d'autre part [44, 45]. Une étude précédente a également démontré une bonne activité anti-inflammatoire [46]. C'est une plante annuelle, vivace, ferme, dressée (60 à 150 cm) et puissante. Elle est caractérisée par de grandes feuilles vertes et des fleurs jaunes (figure 5.2). Elle est endémique pour l'Algérie et la Tunisie [47].

Embranchement: Angiospermes

Classe: Dicotylédones

Ordre: Astérales

Famille: Compositae

Sous famille: Tubiflores

Tribu: Cynarées

Genre: *Centaurea*

Espèce: *Centaurea africana* Lamk, variété *africana* (Bonnet) M.



Figure 5.2: Les feuilles et les fleurs de l'espèce *C. africana*

5.3.4 Travaux antérieurs sur *Centaurea africana*

C. africana est une espèce végétale très peu étudiée. En effet, jusqu'à ce jour, elle n'a fait l'objet que de 2 études phytochimiques dont l'objectif correspond à l'isolement et à la détermination structurale des molécules naturelles de *C. africana*.

Le professeur SEGHIRI Ramdane, qui est le premier à étudier cette plante, a identifié pour la première fois un composé qu'il nomma «Algerianin». Ses travaux ont été effectués sur l'extrait chloroformique et l'extrait d'acétate d'éthyle et ont mené à l'obtention de 29 produits purs. Il a pu établir, à l'heure actuelle, la structure de 19 produits d'entre eux. Il s'agit de :

*** Huit flavonols :**

5,7,3'-trihydroxy 6, 3,4'-triméthoxyflavone (Centaureidine)

5,6,8,3'-tetrahydroxy-3,7,4'- triméthoxyflavone

5,3'-dihydroxy-3,7,8,4' tetraméthoxyflavone ou 3'- hydroxyflindulatine ou 3,7,8,4'- tetraméthyl gossypétine

5,7,4'-trihydroxy-3,6,3'-triméthoxyflavone (Jaceidine)

8-méthylgossypétine ou corniculatusine

5,7,8-trihydroxy-3'-O- rhamnosylflavone

7-O-β-D-glucopyranosyl centaureidine

7-(6''-sinapyl-O-β-D- glucopyranosyle) centaureidine

*** Trois flavones méthoxylées :**

5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxyflavone (CHRYSOERIOL)

5,7,4'-dihydroxy-6-methoxyflavone (Hispiduline)

3',4',5,7-tetrahydroxy-6-methoxyflavone (népétine).

*** Trois esters phénoliques et un acide phénolique.**

*** Deux stérols dont un glucosylé.**

* Deux triterpènes.

Un autre travail à caractère phytochimique et structural portant sur l'investigation de la phase *n*-butanol de l'extrait hydroéthanolique des parties aériennes de *C. africana* (Bonnet) M. (Compositae) a été effectué en complément de l'étude réalisée par le Pr. SEGHIRI Ramdane et a permis l'obtention de 7 produits purs. La structure chimique a été établie pour deux d'entre eux. Il s'agit des flavones glycosylés suivants :

* Apigénine 7-O-glucoside.

* 5-methoxy apigénine 7-O-glucoside

Les structures ont été établies par la combinaison des données de la RMN 1H et sa séquence bidimensionnelle COSY (1H-1H), ainsi que par la spectrophotométrie UV-Visible.

Les résultats obtenus confirment que *C. africana* est très riche en composés phénoliques, notamment les flavonoïdes dont de nombreuses publications scientifiques soulignent des propriétés biologiques remarquables.

Références bibliographiques

- [1] Li XZ, Zhang SN, Liu SM, Lu F. Recent advances in herbal medicines treating Parkinson's disease. *Fitoterapia*. 2013; 84:273-85.
- [2] Ittiyavirah SP, Hameed J. Herbs treating Parkinson's disease. *Biomed. Aging Pathol*. 2014; 4(4):369-76.
- [3] Tanaka K, Miyake Y, Fukushima W, Sasaki S, Kiyohara C, Tsuboi Y, Yamada T, Oeda T, Miki T, Kawamura N, Sakae N, Fukuyama H, Hirota Y, Nagai M; Fukuoka Kinki Parkinson's Disease Study Group. Intake of Japanese and Chinese teas reduces risk of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2011; 17:446–50.
- [4] Shan CS, Zhang HF, Xu QQ, Shi Y-H, Wang Y, Li Y, Lin Y and Zheng G-Q. Herbal Medicine Formulas for Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trials. *Front Aging Neurosci*. 2018; 10.
- [5] Rabiei Z, Solati K, Amini-Khoei H. 2019. Phytotherapy in treatment of Parkinson's disease: a review. *Pharm Biol*. 57(1):355–362.
- [6] Kartika B, Muralidharan P, Rahman H. Herbal treatment of Parkinsons: A review. *IISPRR* 2010; 5(3), article-034.
- [7] Mandel JR, Barker MS, Bayer RJ, Dikow RB, Gao T, Jones KE, Keeley S, Kilian N, Ma H, Siniscalchi CM, Susanna A, Thapa R, Watson L, Funk VA. The Compositae Tree of Life in the age of phylogenomics. *J Syst Evol*. 2017; 55(4):405-410.

- [8] Quezel P, Santa S. Nouvelle Flore D'Algérie Et Des Régions Désertiques Méridionales, Tome II, CNRS, Paris; 1963(2).
- [9] Azzouzi D, Mekkiou R, Chalard P, Chalchat JC, Boumaza O, Seghiri R, Benayache F, Benayache S. Essential oil composition of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) from Algeria. Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.; 2016; 8 (9): 1545-1548.
- [10] Ayad R, Ababsa ZE, Belfadel FZ, Akkal S, León F, Brouard I, Medjroubi K. Phytochemical and biological activity of Algerian *Centaurea melitensis*. Int. J. Med. Arom. Plant. 2012; 2(1):151-154.
- [11] Djeddi S, Argyropoulou C, Chatter R. Analgesic properties of secondary metabolites from Algerian *Centaurea pullata* and Greek *C. grisebachii* ssp. *grisebachii*. J Appl Sci Res. 2012; 8(6):2876- 2880.
- [12] Medjroubi K, Benayache F, Bermejo J. Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*. Antiplasmodial and cytotoxic activities. Fitoterapia. 2005; 76: 744-746.
- [13] Ciric A, Karioti A, Glamoclija J, Sokovic M, Skaltsa H. Antimicrobial activity of secondary metabolites isolated from *Centaurea spruneri* Boiss. & Heldr. J Serb Chem Soc. 2011; 76:27-34.
- [14] Koukoulitsa C, Geromichalos GD, Skaltsa H. VolSurf analysis of pharmacokinetic properties for several antifungal sesquiterpene lactones isolated from Greek *Centaurea* sp. J Comput Aid Mol Des. 2005; 19(8): 617-623.
- [15] Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. Assessment of the antioxidant potential and fatty acid composition of four *Centaurea* L. taxa from Turkey. Food Chem. 2013; 141(1): 91-97.
- [16] Zater H, Huet J, Véronique F, Benayache S, Stévigny C, Duez P, Benayache F. Chemical constituents, cytotoxic, antifungal and antimicrobial properties of *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire. Asian Pac. J. Trop. Med. 2016; 9(6):554–561.
- [17] Al-Snafi AE. Medicinal plants with central nervous effects (part 2): plant based review. IOSR Journal of Pharmacy (IOSRPHR). 2016; 06(08):52-75.
- [18] Al-Snafi AE. The pharmacological importance of *Centaurea cyanus*- A review. Int J of Pharm Rev & Res. 2015; 5(4): 379-384.
- [19] Yousuf S, Atif F, Ahmad M, Ishrat T, Khan B, Islam F. Neuroprotection Offered by Majun Khadar, a Traditional Unani Medicine, during Cerebral Ischemic Damage in Rats. Evid Based Complement Alternat Med. 2011; 2011:1-9.
- [20] Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. « Natural Products (Secondary Metabolites) », dans Buchanan, Gruissem, Jones (éds.), Biochemistry and Molecular Biology of Plants, Rockville (Maryland, États-Unis), American Society of Plant Physiologists, 2000 chap. 24.

- [21] Öksüz S, Serin S. Triterpenes of *Centaurea ptosimopappoides*. *Phytochemistry*. 1997; 46(3):545-548.
- [22] Negrete RE, Backhouse N, Prieto P, Mejias H, Camargo RC, Cassels BK, Breitmaier E, Hartmann R. Steroids, A lignan and A flavonoid from *Centaurea melitensis L*. *Plantes médicinales et phytothérapie*. 1989; (23)4: 293-304.
- [23] Sarker SD, Laird A, Nahar L, Kumarasamy Y, Jaspars M. Indole alkaloids from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae). *Phytochemistry*. 2001; 57(8):1273-12.
- [24] Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonamone A, Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med*. 2002; 113:716 886.
- [25] Wollgast J, Anklam E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health. *Food Res. Int*. 2000; 33:449-59.
- [26] Dangles O, Stoeckel C, Wigand MC, Brouillard R. Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. *Tetrahedron Lett*. 1992; 33:5227-30.
- [27] Hagerman AE, Ried KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Riechel TL. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem*. 1998; 46:1887-92.
- [28] Babar Ali M, Hahn EJ, Paek KY. Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules*. 2007; 12:607-621.
- [29] Gulcin İ, Huyutb Z, Elmastaşç MY, Aboul-Enein HY. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian J Chem*. 2010; 3(1): 43–53.
- [30] Rambaran TF. Nanopolyphenols: a review of their encapsulation and anti-diabetic effects. *SN Appl. Sci*. 2020; 2 1335.
- [31] Crane FL, Bottger M. Plasma membrane redox systems. *Protoplasma*. 2001; 217:1–2. doi: 10.1007/BF01289405.
- [32] Middleton JRE, Chithan K. The impact of plant flavonoids on mammalian biology implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne J.B., editor. *The Flavonoids: advances in research since 1986*. London, UK: Chapman and Hall; 1993.
- [33] Grange JM, Davey RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J. R. Soc. Med*. 1990; 83:159–60.
- [34] Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, O'Neal JM, Cornwell T, Pastor I, Fridlender B. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol*. 2002; 20:522-531.

- [35] Da silva EJA, Oliveira AB, Lapa AJ. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 1994; 46(2):118-22.
- [36] Middleton EJ. Biological properties of plant flavonoids: an overview. *Int. J. Pharmacol.* 1996; 34 (5):344-348.
- [37] Vrijssen REL, Van hoof LM, Vlietinck AJ, Vlietinck AJ, Vanden Berghe DA, Boeyé A. The poliovirus-induced shut-off of cellular protein synthesis persists in the presence of 3-methylquercetin, a flavonoid which blocks viral protein and RNA synthesis. *Antivir. Res.* 1987; 7(1):35-42.
- [38] Ohemeng KA, Schwender CF, Fu KP, Barrett JF. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1993; 3(2):225-30.
- [39] Kato R, Nakadate T, Yamamoto S, Aizu E. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced tumor promotion and ornithine decarboxylase activity by quercetin: possible involvement of lipoxygenase inhibition. *Carcinogenesis.* 1983; 4(10):1301-5.
- [40] Wattenberg Lee W. Anticarcinogenic effects of several minor dietary components. *Foods, Proc. Int. Conf.* 1983; 157-66.
- [41] Bu-abbas A, Clifford MN, Ioannides C, Walker C. Stimulation of rat hepatic UDPglucuronosyl transferase activity following treatment with green tea. *Food chem. Toxicol.* 1995; 33(1):27-30.
- [42] Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin.Nutr.* 1995; 61(3):549-54.
- [43] Martens S, Mithöfer. "Corrigendum to "Flavones and flavones synthases". *Phytochemistry.* 2006; 67(5):521.
- [44] Seghiri R, Boumaza O, Mekkiou R, Benayache S, Mosset P, Quintana J, Estevez F, Leon F, Bermejo J, Benayache F. A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochem Lett.* 2009; 2(3):114-118.
- [45] Seghiri R, Mekkiou R, Boumaza O, Benayache S, Bermejo J, Benayache F. phenolic compounds from *Centaurea africana*. *ChemNatCompd.* 2006; 42:610-611.
- [46] Zaouani M, Bitam A, Baz A, Nenali Y, Ben-Mahdi MH. *In vivo* evaluation of wound healing and anti-inflammatory activity of methanolic extract of roots of *Centaurea africana* (L.) in a topical formulation. *Asian J Pharm Clin Res.* 2017; (10):341-346.
- [47] Quezel, P. and Santa, S. (1963), Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1 C.N.R.S. Paris.

Deuxième Partie :

Partie pratique

Chapitre 6 : Matériels et méthodes

6.1 Matériel végétal et screening phytochimique

La plante *C. africana* a été récoltée en mois de juin 2014 du parc national d'El-Kala de la Wilaya d'El-Taref (21 m, 36° 53' 44" N, 8° 26' 35" E). Les échantillons ont été lavés puis séchés à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant environ 10 jours. Ils ont été ensuite collectés dans des sacs propres pour servir ultérieurement à l'extraction. L'identification botanique a été réalisée par le professeur KAABECHE Mohammed, Université de Sétif (spécimen de référence CCA0501).

6.1.1 Préparation des extraits

Les parties aériennes (feuilles et fleurs, 1 kg) ont été mises en macération à température ambiante dans un mélange hydroalcoolique (Ethanol/Eau; 80/20; v/v) 3 fois pour une période de 48 heures chacune. Le solvant a été évaporé à 35 °C sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'extrait concentré. Dilué avec l'eau distillée (400 ml), cet extrait a subi une extraction successive de type liquide-liquide, en utilisant des solvants de polarité croissante ; le chloroforme, l'acétate d'éthyle (AcOEt) et le *n*-butanol (*n*-BuOH), successivement (figure 6.1). Ce travail a été réalisé au niveau de l'Unité de Recherche et de Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Faculté des Science Exactes, Université des Frères Mentouri, Constantine. La figure 6.1 récapitule les différentes étapes d'extraction réalisées. L'extraction a été réalisée par Mansour Amira sous la supervision du professeur SEGHIRI Ramdane.

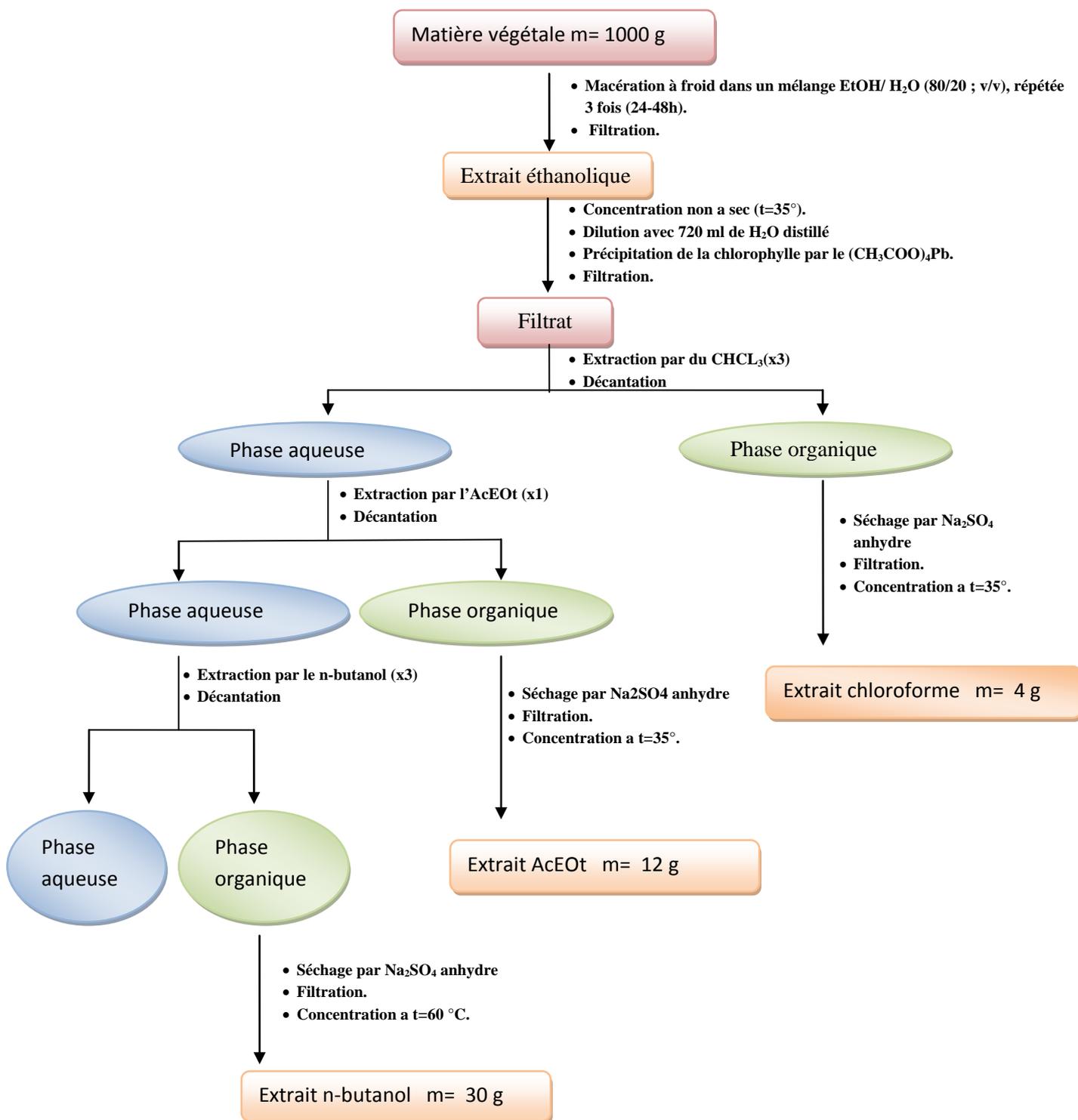


Figure 6.1 : Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de *Centaurea africana*

6.1.2 Dosage des polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques des extraits (AcOEt et *n*-BuOH) de *C. africana* a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu selon Singleton et ses collaborateurs [1]. Elle est basée sur les capacités réductrices des complexes ioniques polymériques formés à partir des acides phosphomolybdiques et phosphotungstiques (réactif de Folin-Ciocalteu) par les composés phénoliques. Il en résulte la formation d'un complexe bleu qui accompagne l'oxydation des

composés phénoliques et qui est stabilisé par l'addition de carbonate de sodium (NaCO_3). On mélange 125 μl d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol avec des dilutions convenables) avec 125 μl de réactif de Folin-Ciocalteu et 500 μl d'eau distillée, puis on laisse reposer à température ambiante pendant 5 min, puis on ajoute 1250 μl de sodium carbonate (Na_2CO_3). Après 2 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765 nm. Le dosage des phénols totaux est effectué par la comparaison de l'absorbance observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique. Les valeurs sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg GAE/g d'extrait).

6.1.3 Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur totale en flavonoïdes a été déterminée à l'aide de la méthode colorimétrique d'Ordonez et ses collaborateurs [2]. Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par chlorure d'aluminium (AlCl_3). Elle entraîne la formation d'un complexe brunâtre qui absorbe à 420 nm. Le taux des flavonoïdes est obtenu à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de la quercétin. Les valeurs sont exprimées en mg équivalent de quercétin par g d'extrait (mg QE /g d'extrait).

6.1.4 Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS)

Dans la séparation et l'analyse quantitative des composés de la fraction butanolique de *C. africana*, on a utilisé le Thermo Scientific-Dionex ultime 3000-TSQ Quantum avec la colonne Thermo ODS Hypersil 250 x 4,6 mm, 5 μm , dans les conditions suivantes : Volume d'injection : 20 μL ; Phase mobile : Eluant A (eau avec 0,1 % d'acide formique) et Eluant B (méthanol) ; Débit : 0,70 mL/mn à 40 °C ; Gradients : 0-1 min, 100 % A, 1-22 min, 5 % A, 25 min, 5 % A, 30 min 0 % A ; Durée totale du processus : 30 mn. Les extraits ont été préparés à 1 mg/ml et analysés.

La relation entre l'aire du pic et la concentration s'est avérée linéaire de 0,5 à 10 mg/L (ppb) pour chaque composé. La linéarité a été évaluée en utilisant une analyse de régression linéaire de six points pour chaque composé. Le tracé linéaire se compose de trois répétitions par point. Pour tous les analytes, les coefficients de corrélation (valeurs R^2) étaient $\geq 0,99$. Les valeurs de la limite de détection (LOD) et de la limite de quantification (LOQ) des composés pour la méthode LC-MS/MS sont données dans le tableau S1. La LOD et la LOQ ont été déterminées en utilisant des mesures de blancs de réactifs enrichis avec de faibles concentrations d'analyte selon le guide EURACHEM. La solution à blanc a été enrichie à 0,1 ppm du standard. LOD et LOQ ont été calculés comme $\text{LOD} = 3 * S_0$ et $\text{LOQ} = 10 * S_0$.

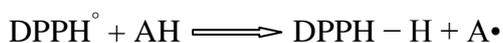
6.2 Les tests biologiques

6.2.1 L'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante des deux extraits *n*-BuOH et AcOEt de *C. africana*

Beaucoup de tests standardisés évaluant l'activité antioxydante ont été retenus dans le cadre de cette étude.

6.2.1.1 Détermination de l'activité antiradicalaire des extraits par le test DPPH°

L'effet anti-radicalaire des deux extraits (AcOEt et *n*-BuOH) de *C. africana* a été évalué *in vitro* par la méthode de DPPH° (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl) décrite par Ohinishi et ses collaborateurs [3]. Le radical DPPH° est stable à température ordinaire et présente une couleur violette bien caractéristique. Les antioxydants, donneurs de proton H⁺ présents dans l'échantillon, le réduisent entraînant un changement de la couleur vers le jaune facilement mesurable par spectrophotométrie à 517 nm.



L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons.

Le DPPH°, l'acide ascorbique et l'extrait ont été préparés préalablement dans le méthanol. Pour chaque concentration (0-100-200-300-400-600 µg/ml), 1 ml d'échantillon a été ajouté à 1 ml de solution de DPPH° (0,2 mM). Après 30 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été lue à 517 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide ascorbique a été utilisée comme contrôle positif et le pourcentage d'activité de piégeage de DPPH° (I %) a été calculé en utilisant l'équation :

$$I \% = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100.$$

A₀ : Absorbance de la solution de DPPH° seule

A₁ : Absorbance de la solution de DPPH° + l'extrait *n*-BuOH ou AcOEt de *C. africana*, ou la l'acide ascorbique.

La concentration d'extrait réduisant 50% de DPPH° (IC₅₀) est obtenue à partir de la courbe donnant de la variation du pourcentage d'inhibition du radical DPPH° (I %) en fonction des concentrations croissantes des extraits et de la vitamine C.

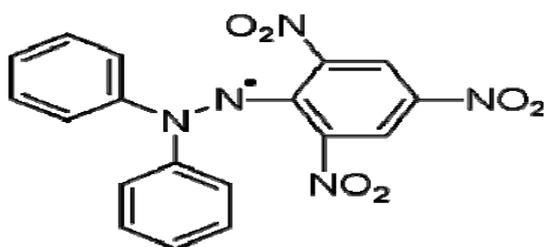


Figure 6.2. Structure chimique du radical libre DPPH° (2,2 Diphényle-1-Picryl-Hydrazyl).

6.2.1.2 Le test du pouvoir réducteur du Fer

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) des deux extraits (AcOEt et *n*-BuOH) a été déterminé selon la méthode rapportée par Oyaizu [4]. Cette méthode basée sur la capacité des antioxydants présents dans les extraits de plante à réduire le fer ferrique Fe^{3+} du complexe ferricyanide en fer ferreux Fe^{2+} . Cette réduction se traduit par une coloration verte dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur. L'absorbance est lue à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des composés testés.

Un volume de 2,5 ml de l'échantillon à différentes concentrations est mélangé avec 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6.6) et 2,5 ml de ferricyanide de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] (1%). Le mélange est incubé à 50 °C pendant 20 min. Ensuite, 2,5 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 10% est ajouté au milieu réactionnel. Puis les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. Un aliquote de 2,5 ml du surnageant est combiné à 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel est faite à 700 nm contre un blanc préparé en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil. Le pourcentage de pouvoir réducteur de fer est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Pouvoir réducteur de fer \%} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

A_0 : Absorbance du blanc.

A_1 : Absorbance en présence de l'échantillon/référence.

6.2.1.3 Inhibition de la peroxydation lipidique (LPO) induite par le système Fe^{2+} /acide ascorbique

La peroxydation lipidique induite par le système Fe^{2+} /acide ascorbique dans l'homogénat du foie de rat a été utilisée selon la méthode de Bishayee et ses collaborateurs [5]. Elle a été estimée par le taux du MDA selon la méthode d'Ohkawa et ses collaborateurs [6]. Le mélange réactionnel contenant l'homogénat du foie de rat (0,1 ml, 25 % p/v) dans du Tris-HCl (30 mM), du sulfate d'ammonium ferreux (0,16 mM), de l'acide ascorbique (0,06 mM) et différentes concentrations des deux extraits (*n*-BuOH et AcOEt) de *C. africana* dans un volume final de 0,5 ml a été incubé pendant 1 heure à 37 °C et la substance à réaction thiobarbiturique résultante (TBARS) a été mesurée à 532 nm. L'acide ascorbique a été utilisé comme référence. Les résultats ont été calculés, en pourcentage d'inhibition, selon l'équation suivante :

$$I \% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} * 100$$

A_0 : Absorbance du blanc ; A_1 : Absorbance en présence de l'échantillon/référence.

6.2.2 Étude de l'activité anti-inflammatoire des deux extraits *n*-BuOH et AcOEt de *C. africana*

6.2.2.1 Activité de piégeage de l'oxyde nitrique (NO)

La procédure repose sur le principe que le nitroprussiate de sodium en solution aqueuse à pH physiologique génère spontanément de l'oxyde nitrique qui interagit avec l'oxygène pour produire des ions nitrites pouvant être estimés à l'aide du réactif de Griess selon la méthode de Marcocci et ses collaborateurs [7]. Le nitroprussiate de sodium (5 mM), dans une solution saline tamponnée au phosphate, a été mélangé à différentes concentrations des deux extraits (AcOEt et *n*-BuOH) de *C. africana* et incubé à température ambiante pendant 120 min. Après la période d'incubation, 0,5 mL de réactif de Griess a été ajouté.

L'absorbance a été mesurée à 546 nm. Le pourcentage d'inhibition a été calculé par la formule suivante :

$$[(A0 - A1) / A0] \times 100 \% ; \text{ où}$$

A0 était l'absorbance de la réaction de contrôle négative et

A1 était l'absorbance en présence de l'échantillon / standard (BHT).

6.2.2.2 Induction de l'œdème dans la patte par la carragénine

La méthode décrite par Srivastava et ses collaborateurs [8] a été utilisée. 20 rats albinos *Wistar* provenant de l'élevage au niveau de l'animalerie de l'Université des Frères Mentouri Constantine ont été répartis en 4 lots de 5 rats chacun.

Groupe témoin : Les rats ont reçu par voie orale (p.o) une solution de NaCl à 0,9%.

Groupe contrôle positif : les rats ont reçu oralement le Diclofénac-sodique à une dose de (10 mg/kg).

Groupe test (1) : les rats de ce groupe ont reçu l'extrait *n*-BuOH de *C. africana* par gavage aux doses de 200 mg/kg.

Groupe test (2) : les rats de ce groupe ont reçu l'extrait AcOEt de *C. africana* par gavage aux doses de 200 mg/kg.

Une heure plus tard, l'inflammation chimique a été provoquée par l'injection de 0,1 ml de carragénine à (1 %) dans une solution saline isotonique sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche des rats [9].

6.2.2.2.1 Détermination du volume de l'œdème de la patte

L'effet anti-inflammatoire a été évalué en mesurant le volume de l'œdème de la patte (1 h, 3 h et 6 h) après l'injection de la carragénine en utilisant le vernier caliper numérique.

L'œdème a été traduit par une augmentation de l'épaisseur des pattes (mm) qui est due à la provocation inflammatoire. Pour chaque groupe traité avec les extraits ou le diclofénac, les diamètres moyens obtenus (Dt) ont été comparés à celui obtenu avant tout traitement (D0).

Tandis que le pourcentage d'inhibition de l'œdème a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{Dt}-\text{D0}) \text{ témoin} - (\text{Dt}-\text{D0}) \text{ traité}}{(\text{Dt}-\text{D0}) \text{ témoin}} * 100$$

24 heures après l'injection d' γ -carragénine (1 %), les rats sont sacrifiés par dislocation cervicale, la voûte plantaire de la patte droite est récupérée, rincée par l'eau physiologique saline (0,9 %), puis pesée et partagée en deux parties (sensiblement de poids égal).

Une des deux parties du tissu est additionnée à la solution tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4 dans une proportion de (1V/10V), contenant du KCl (1,15 M) ; le mélange est ensuite homogénéisé et centrifugé à 3600 tours/minute pendant 10 minutes à 4 °C, puis à 9600 tour/minute pendant 45 minutes à 4°C. La fraction tissulaire est récupérée et utilisée pour le dosage du taux du MDA. L'autre partie du tissu est utilisée pour le dosage du taux de la MPO.

6.2.2.2.2 Mesure de l'activité de myéloperoxydase (MPO)

L'accumulation des neutrophiles dans la patte des rats a été mesurée par l'évaluation de l'activité de la myéloperoxydase (MPO). L'activité de la MPO dans les homogénats des pattes a été évaluée par la mesure du changement d'absorption à $\lambda=450$ nm en présence d'*o*-dianisidine dihydrochlorure et 0,005% de H₂O₂ selon le protocole de bradley et ses collaborateurs [10].

L'activité de la MPO est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire ($1.13 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{M}^{-1}$) de *o*-dianisidine oxydé. Les résultats sont exprimés en MPO U/mg de tissu dont l'unité (U) de l'activité MPO a été définie telle que la conversion de 1 μmol de H₂O₂ en eau dans 1 min à 25 °C.

6.2.2.2.3 Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Malondialdéhyde (MDA) est un produit de décomposition oxydative des lipides insaturés. Le taux de MDA a été mesuré dans les homogénats des pattes des rats. Ce dosage est réalisé selon la méthode d'Ohkawa et ses collaborateurs [6]. Le principe de ce dosage repose sur la liaison, en milieu acide (pH = 2 à 3) et chaud, du MDA avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un pigment rosé ; le complexe MDA-(TBA)₂, qui absorbe à une longueur d'onde de 532 nm. Les résultats sont exprimés en nmol par milligramme de tissu intra plantaire (nmol/mg tissu) en utilisant le coefficient d'extinction molaire $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{M}^{-1}$.

6.2.3 Étude de l'activité neuroprotective de l'extrait *n*-BuOH de *C. africana* in vivo

Animaux

Les animaux utilisés dans cette expérimentation sont des rats males de souche albinos *Wistar*, issus d'un élevage au niveau de l'animalerie de l'Université des Frères Mentouri Constantine. Toutes les expériences sur les animaux ont strictement respecté la charte sur l'éthique de l'expérimentation animale. Les rats sont divisés en 5 groupes de 8 rats dans des cages standards pour une période d'acclimatation (15 jours) avant d'être utilisés dans notre expérience. Pendant cette période, les animaux ont un accès libre à la nourriture et à l'eau (croquettes provenant de la société de production des aliments d'animaux, Bouzaréat, Alger), l'eau de boisson est servie dans des biberons et renouvelée quotidiennement. Les animaux sont maintenus dans l'animalerie à une température constante (22 ± 2 °C) et sont soumis à un cycle de lumière/obscurité de 12/12 h. Les rats sont logés dans des cages, tapissés d'une litière composée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière a été changée chaque jour.

6.2.3.1 Induction de la neurotoxicité et traitement des rats

Pour induire la neurotoxicité, les rats ont été traités par injection intrapéritonéale (Ip) de la ROT préparée dans l'eau physiologique (NaCl 0,9 %).

Les rats ont été divisés en 5 groupes.

Groupe 1 : non traité.

Groupe 2 : les rats de ce groupe ont été traités par la roténone (ROT) ; une dose (Ip) de (1 mg/kg) pendant 21 jours [11, 12].

Groupe 3 : les rats de ce groupe ont été traités avec l'extrait *n*-BuOH de *C. africana* (BECA) par gavage à la dose (200 mg/kg) pendant 16 jours, et par une dose (Ip) de la ROT (1 mg/kg) pendant 21 jours.

Groupe 4 : les rats contrôle positif ont reçu de la lévodopa-carbidopa (L-Dopa) par gavage à une dose de (30 mg/kg) [13], et de la ROT à une dose (Ip) de (1 mg/kg) pendant 21 jours.

Un intervalle de temps de 30 minutes a été maintenu entre l'administration de ROT et le médicament test/standard.

Groupe 5 : les rats de ce groupe ont été traités avec l'extrait *n*-BuOH de *C. africana* (BECA) par gavage à la dose (200 mg/kg) pendant 16 jours.

6.2.3.2 Les tests comportementaux

6.2.3.2.1 Score comportemental du mouvement général

Des évaluations comportementales ont été effectuées avant le début du traitement, puis régulièrement, à un intervalle de 7 jours après le traitement. Une quantification comportementale finale a été effectuée après 24 h de la dernière dose.

Un score de comportement de mouvement général a été déterminé à l'aide de l'échelle d'analyse du mouvement de Ludolph [14]. La notation a été réalisée selon le schéma suivant:

Score = 0 :

Comportement normal,

Score = 1 :

Lenteur générale du déplacement résultant d'une déficience légère des membres postérieurs,

Score = 2 :

Incoordination et anomalies marquées de la démarche,

Score = 3 :

Paralysie des membres postérieurs,

Score = 4 :

Incapacité de mouvement résultant d'une paralysie des membres antérieurs et postérieurs,

Score = 5 : Décubitus.

6.2.3.2.2 Le test de la Catalepsie

Le test de la catalepsie consiste à placer un animal dans une position inhabituelle et à enregistrer le temps pris pour corriger cette position. Les deux pattes antérieures des rats ont été placées sur une barre positionnée à 9 cm du sol. Le temps entre le moment où l'animal a été placé sur la barre et le moment où il a retiré complètement les deux pattes de la barre a été mesuré [15].

NB : Après les tests comportementaux, les rats ont été décapités par dislocation cervicale et les cerveaux ont été immédiatement prélevés pour servir aux études biochimiques, aux études neurochimiques et aux études histopathologiques.

6.2.3.3 Estimation des marqueurs neurochimiques

6.2.3.3.1 Estimation de la teneur en dopamine

La détermination quantitative des niveaux de DA a été effectuée par fluorométrie selon la méthode de Chang [16] modifiée par Ciarlone à l'aide d'un spectrofluoromètre [17]. Les échantillons de cerveau ont été décongelés le jour de l'expérience. Une aliquote de tissus cérébraux a été homogénéisée avec du *n*-butanol acidifié pour donner 10% en poids /volume (p/v) d'homogénat.

La méthode est basée sur l'estimation des fluorophores dopaminergiques formés après oxydation par l'iode à des longueurs d'onde d'excitation/émission de 320/375 nm. Les résultats ont été exprimés en ng/mg de tissu.

6.2.3.3.2 Détermination de la teneur en L-glutamate

Des volumes égaux d'homogénat et d'acide perchlorique 1,2 M ont été mélangés, centrifugés à 600 xg à 4 °C pendant 15 min et le surnageant a été utilisé selon la méthode de Lund [18]. Le kit de détermination de glutamine/glutamate a été utilisé pour la mesure spectrophotométrique du L-glutamate via la désamination enzymatique de la L-glutamine et la déshydrogénation du L-glutamate.

6.2.3.4 Évaluation des marqueurs du stress oxydant au niveau du cytosol

6.2.3.4.1 Préparation de la fraction cytosolique

Les cerveaux ont été bien lavés avec le NaCl (0,9 %) et coupés en petits morceaux, pesés puis homogénéisés (pour 1 g du cerveau 9 mL de solution tampon phosphate (0,1 M; pH 7,4) contenant le KCl (1,15 %)). L'homogénat a été ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min à 4 °C, le surnageant récupéré a été centrifugé à 9600 rpm pendant 45 minutes à 4 °C. Le dernier surnageant (fraction cytosolique) récupéré a été utilisé pour le dosage des marqueurs du stress oxydatif.

6.2.3.4.2 Dosage de malondialdéhyde (MDA)

Le MDA a été dosé selon la méthode d'Ohkawa et ses collaborateurs [6] décrits auparavant.

Le dosage est basé sur les étapes suivantes : à 0,5 mL de la fraction cytosolique, nous avons additionné 0,5 mL d'acide trichloracétique (TCA) 25 % et 1 ml d'acide Thiobarbiturique (TBA) 0,67 %. Après mélange, la préparation a été placée pendant une heure dans le bain-marie à 95 °C, refroidie puis on a ajouté 4 ml de butanol pendant 2 minutes sous agitation avant de procéder à la centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min à 4°C.

La quantité du MDA dans l'échantillon a été exprimée en nm/gramme de tissu. Elle est obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec du 1,1,3,3-tetraoxypropane dans les mêmes conditions.

6.2.3.4.3 Mesure de l'activité cérébrale de la paraoxonase 1 (PON1)

L'activité PON1 a été mesurée par spectrophotométrie dans les surnageants tissulaires en utilisant du phénylacétate comme substrat selon la méthode décrite par Eckerson et ses collaborateurs [19]. Ce test implique l'hydrolyse du phénylacétate par l'activité de PON1/arylestérase libérant du phénol. L'activité est exprimée en kU/g tissue, sur la base du coefficient d'extinction du phénol de $1,310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à $\lambda = 270 \text{ nm}$. Une unité a été définie comme la quantité d'enzyme qui désintègre 1 nmol phénylacétate par minute.

6.2.3.4.4 Dosage de glutathion (GSH)

Le dosage du glutathion a été réalisé selon la méthode de Sedlak et Hanus [20]. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (réactif d'Ellman, DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela une déprotéinisation de l'homogénat est indispensable afin de garder uniquement les groupements thiol spécifiques du glutathion.

Le TNB à pH alcalin (8-9), présente une absorbance à $\lambda = 412$ nm avec un coefficient d'extinction molaire de GSH de $13100 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Les concentrations sont exprimées en nmol/mg de protéine ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protéine).

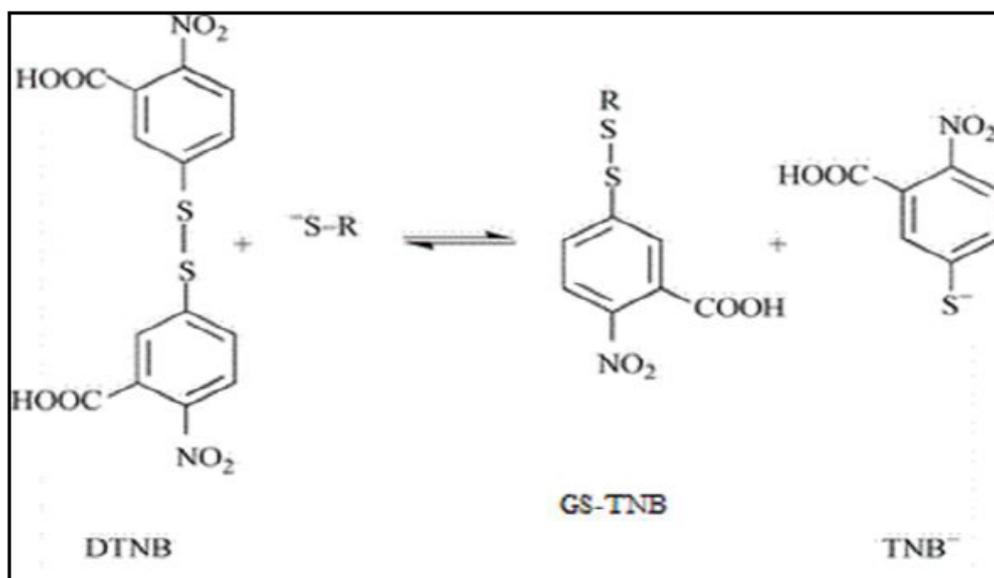


Figure 6.3: Réaction d'Ellman

6.2.3.4.5 Dosage de la glutathion peroxydase (GPx) cytosolique

L'activité enzymatique de la GPx a été mesurée par la méthode utilisée par Rotruck et ses collaborateurs [21]. Cette méthode est basée sur la réduction du H₂O₂ en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en disulfure de glutathion (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



La quantité du glutathion restante réagit avec la solution DTNB pour donner un composé coloré qui est mesuré par spectrophotométrie à $\lambda = 420$ nm. L'activité de la GPx est exprimée en U/mg protéine du cerveau (U : μmol de GSH oxydé/min).

6.2.3.4.6 Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST)

La mesure de l'activité de la GST consiste à fournir à l'enzyme un substrat, en général, le 1-chloro,2,4-dinitrobenzène (CDNB), qui se conjugue facilement avec le glutathion sous l'action de la

GST. La méthode utilisée dans cette étude pour évaluer l'activité de la GST est celle de Habig et ses collaborateurs [22].

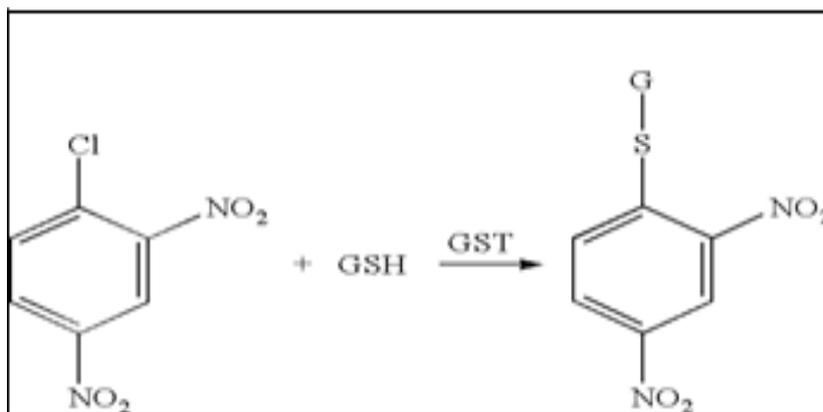


Figure 6.4 : Réaction de Conjugaison CDNB-GSH par la GST

Cette méthode consiste à faire agir les GSTs contenues dans l'échantillon sur un mélange (GSH + CDNB) à une température de 37 °C et à un pH de 6,5. La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée à une longueur d'onde de 340 nm. Les résultats sont obtenus en utilisant un coefficient d'extinction molaire de CDNB : $9,6 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ et sont exprimés en U/mg de protéine (U: μmol de conjugué CDNB formé/min).

6.2.3.4.7 Dosage de la glutathion réductase (GR) cytosolique

L'activité de la GR a été mesurée selon la méthode de Moss et Butterworth [23]. Le principe du dosage est basé sur la réduction du GSSG en GSH par le NADPH en présence de GR. L'activité est mesurée en suivant la diminution de l'absorbance du NADPH à $\lambda = 340 \text{ nm}$.

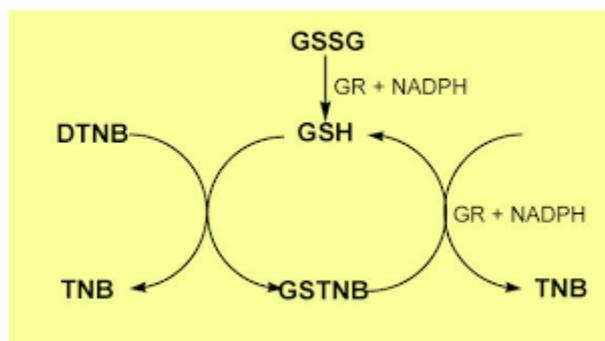
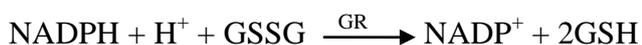


Figure 6.5: Réaction de réduction du GSSG en GSH par le NADPH en présence de GR

L'activité de l'enzyme est calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire de NADPH : $6,25 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Les résultats sont exprimés en U/mg de protéine (U: μmol NADPH oxydé/min).

6.2.3.5 Évaluation des marqueurs du stress oxydant au niveau des mitochondries

6.2.3.5.1 Préparation de la fraction mitochondriale

L'isolement des mitochondries cérébrales a été effectué à 4 °C en utilisant une procédure standard basée sur une centrifugation différentielle [24]. Les échantillons de cerveau ont été rapidement immergés dans un tampon d'isolement glacé (mannitol 220 mmol/L, saccharose 70 mmol/L, acide morpholinopropane sulfonique 5 mmol/L, pH 7,4). Les tissus ont été homogénéisés avec un milieu d'homogénéisation supplémentaire (tampon d'isolement plus EGTA 2 mmol/L) 10 volumes (poids /volume) et par la suite a été centrifugé pendant 10 min à 700 x g. Le surnageant a été recueilli et centrifugé à nouveau pendant 10 min à 10 000 x g à 4 °C. Le culot a été remis en suspension dans un tampon d'isolement et centrifugé deux fois pendant 10 min à 7 000 x g, pour une purification supplémentaire des mitochondries. Ensuite, les culots ont été mis en suspension dans un tampon à une concentration finale de 50 à 100 mg de protéine mitochondriale par mL.

Les fractions mitochondriales du cerveau ont été utilisées pour l'estimation de l'état oxydatif.

Le statut oxydatif a été évalué dans 0,5 ml de la fraction mitochondriale selon les méthodes enzymatiques colorimétriques décrites précédemment.

Le MDA a été évalué par la méthode d'Ohkawa et ses collaborateurs [6], le dosage de GSH a été effectué par la méthode de Sedlak et Hanus [20] et les résultats ont été exprimés en (nmol/mg protéine). L'activité du GPx a été évaluée par la méthode de Rotruck et ses collaborateurs [21], les résultats ont été exprimés en (U/mg protéine). L'activité du GST a été évaluée par la méthode de Habig et ses collaborateurs [22], les résultats ont été exprimés en (U/mg protéine).

6.2.3.5.2 Dosage de l'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD)

Le dosage de la SOD a été réalisé selon la méthode de Marklund [25]. Le principe de cette méthode repose sur la capacité d'inhibition de l'autooxydation du pyrogallol par la SOD. L'absorbance est mesurée à $\lambda = 420$ nm après chaque minute pendant 3 minutes.

L'activité de l'enzyme est exprimée en U/mg de protéine du tissu (U/mg tissu). Une unité de l'activité de la SOD est définie comme l'enzyme qui causerait l'inhibition de 50 % de l'autooxydation du pyrogallol. L'activité de l'enzyme est calculée selon l'équation suivante:

$$\text{Inhibition totale} = \frac{\text{Densité optique du blanc} - \text{Densité optique de l'échantillon}}{\text{Densité optique du blanc}} * 100$$

$$U \text{ de SOD / mg de protéine} = \frac{\text{Inhibition totale}}{n * 50}$$

n : mg de protéines présentes dans le volume de l'échantillon utilisé.

6.2.3.6 Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales est réalisé en utilisant la méthode de Lowry [26].

6.2.3.7 Évaluation du dysfonctionnement mitochondrial / Activité du Complexe I (NADH-coenzyme Q oxydoréductase)

L'activité du complexe I a été mesurée suite à la diminution de l'absorbance due à l'oxydation du NADH à 340 nm [27].

6.2.3.8 Mesure des marqueurs apoptotiques

L'activation de la caspase-3 survenue pendant le processus d'apoptose dans le cerveau de rat a été évaluée conformément au manuel de l'utilisateur du kit de test caspase-3. Le surnageant obtenu par centrifugation de cellules lysées a été ajouté au mélange réactionnel contenant du dithiothréitol et du substrat du caspase-3 (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide), et a été incubé pendant 90 min à 37 °C. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de test de 405 nm.

Des kits d'analyse ont été utilisés dans le strict respect des instructions du fabricant. Les niveaux de marqueurs Bcl-2 et Bax ont été mesurés / dosés dans des lysats de tissus cérébraux par le kit ELISA approprié (Invitrogen, USA), et les résultats ont été exprimés en nmol/mg protéine.

6.2.3.9 Mesure des marqueurs neuroinflammatoires

6.2.3.9.1 Détermination du facteur de nécrose tumorale-alpha

L'estimation du niveau de TNF- α dans le cerveau a été réalisée en utilisant le kit ELISA TNF- α de rat acheté auprès d'Invitrogen (CA, USA). La procédure a été exécutée conformément aux instructions du fabricant.

6.2.3.9.2 Détermination de l'oxyde nitrique (NO)

L'oxyde nitrique a été déterminé par colorimétrie dans le tissu cérébral selon la méthode décrite par Montgomery et Dymock [28]. Ceci est basé sur la mesure de la concentration de nitrite endogène comme indicateur de la production de NO. Cela dépend de l'ajout du réactif Griess qui révèle la présence des nitrites par une réaction de diazotation qui aboutit à la formation d'un chromophore violet foncé absorbant à 540 nm.

6.2.3.9.3 Mesure de l'activité de la Myéloperoxydase (MPO)

La méthode décrite par Bradley et ses collaborateurs [10] a été utilisée pour déterminer l'activité de MPO dans le cerveau.

6.2.3.10 Étude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées dans le service d'Anatomie Pathologique à l'EPH Houari Boumediene, Chelghoum Laid, wilaya de Mila, suivant la technique décrite par Houlot [29].

Références bibliographiques

- [1] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol.* 1999; 299:152-178. DOI: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1.
- [2] Ordonez AAL, Gomez JD, Vattuone MA, Isla MI. Antioxidant activities of *Sechiumedule (Jacq.) Swart* extracts. *Food Chem.* 2006; 97(3):452–458. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.05.024.
- [3] Ohinishi M, Morishita H, Iwahashi H, Toda S, Shirataki Y, Kimura M, Kido R. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. *Phytochemistry.* 1994; 36(3):579-583. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)89778-2.
- [4] Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan J Nutr.* 1986; 44(6):307-315. doi:10.5264/eiyogakuzashi.44.307.
- [5] Bishayee S, Balasubramaniam AS. Lipid peroxide formation in rat brain. *J Neurochem.* 1971; 18:909-20.
- [6] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95:351-358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
- [7] Marcocci L, Packer L, Droy-Lefaix MT, Sekaki A, Gardes-Albert M. Antioxidant action of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Method Enzymol.* 1994; 234:462-475. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)34117-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)34117-6).
- [8] Srivastava S, Singh P, Jha K, Mishra G, Srivastava S, Khosa RL. Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of Aerial Parts of *Costus speciosus* Koen. *Indian J Pharm Sci.* 2013; 75(1):83-88.
- [9] Di rosa M. Biological properties of carrageenan. *J Pharma and Pharmacol.* 1972; 24(2):89-102. doi: 10.1111/j.2042-7158.1972.tb08940.x.
- [10] Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982; 78(3):206-209. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12506462.
- [11] Teema AM, Zaitone SA, Moustafa YM. Ibuprofen or piroxicam protects nigral neurons and delays the development of l -dopa induced dyskinesia in rats with experimental Parkinsonism: Influence on angiogenesis. *Neuropharmacology.* 2016; 107:432–450.

- [12] Sarkar S, Gough B, Raymick J, Beaudoin MA, Ali SF, Virmani A, Binienda ZK. Histopathological and electrophysiological indices of rotenone-evoked dopaminergic toxicity: Neuroprotective effects of acetyl-l-carnitine. *Neurosci. Lett.* 2015; 606:53–59.
- [13] Nade VS, Kawale LA, Zambare SS, Dharmadhikari PP, Pagare PS. Ameliorative Effect of Nebivolol in Parkinson's disease. *AJPP.* 2015; 1(3):116-126.
- [14] Ludolph A, He F, Spencer P, Hammerstad J, Sabri M. 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *The Canadian journal of neurological sciences.* 1991; 18, 492-498.
- [15] Khurana N, Gajbhiye A. Ameliorative effect of *Sida cordifolia* in rotenone induced oxidative stress model of Parkinson's disease. *Neurotoxicology.* 2013; 39:57-64. doi:10.1016/j.neuro.2013.08.005
- [16] Chang CC. A sensitive method for spectrophotometric assay of catecholamines. *Int J Neuropharmacol.* 1964; 3(6):643-649.
- [17] Ciarlone AE. Further modification of a fluorometric method for analyzing brain amines. *Microchem J.* 1978; 23:9-12.
- [18] Lund P. L-Glutamine and L-glutamate: UV-Method with Glutaminase and Glutamate Dehydrogenase. In: Bergmeyer HS, Bergmeyer J editors. *Methods of Enzymatic Analysis.* Vol. VIII. Weinheim, Germany: Verlagsgesellschaft, 1990; pp357-363.
- [19] Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet.* 1983; 35:1126-1138.
- [20] Sedlak J, Hanus L. Changes of glutathione and protein bound SH-groups concentration in rat adrenals under acute and repeated stress. *Endocrinol Exp.* 1982; 16 (2):103-109.
- [21] Rotruck JT, Pope AI, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 1973; 179:588-90.
- [22] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974; 249(22):7130-7139.
- [23] Moss D, Butterworth P. *Enzymology and Medicine.* London: Pitman Medical. 1974; p 139.
- [23] Jonsson M, Jestoi M, NathanailAV, Kokkonen U-M, Anttila M, Koivisto P, Karhunen P, Peltonen K. Application of OECD Guideline 423 in assessing the acute oral toxicity of moniliformin. *Food Chem Toxicol.* 2013; 53:27-32.
- [25] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 1974; 47:469-474.
- [26] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 93:265-275.

- [27] Kishore Kumar SN, Deepthy J, Saraswathi U, Thangarajeswari M, Yogesh Kanna S, Ezhil P, Kalaiselvi P. *Morinda citrifolia* mitigates rotenone-induced striatal neuronal loss in male Sprague-Dawley rats by preventing mitochondrial pathway of intrinsic apoptosis. *Redox Rep.* 2017; 22(6):418-429.
- [28] Montgomery HAC, Dymock J. The determination of nitrite in water. *Analyst.* 1961; 86, 414-416.
- [29] Houlot R. *Techniques d'histologie et de cytologie.* Paris: Edition Maloine. 1984

Chapitre 7 : Résultats

7.1 Screening phytochimique

7.1.1 Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

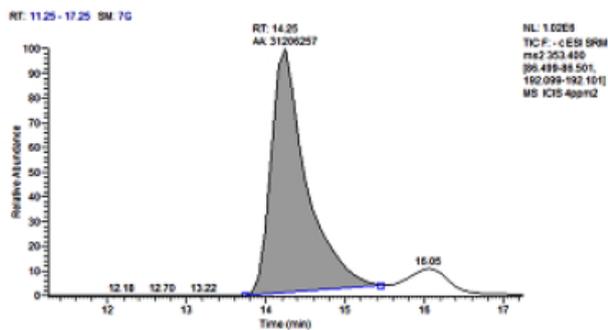
Les résultats de dosage des polyphénols et des flavonoïdes (tableau 7.1) révèlent que la fraction EtOAc de *C. africana* contenait environ deux fois plus de composés phénoliques ($125,24 \pm 10,14$ mg d'AGE/g d'extrait) que la fraction *n*-BuOH ($53,03 \pm 2,50$ mg d'AGE/g d'extrait). En ce qui concerne la teneur totale en flavonoïdes, il a été constaté que la fraction EtOAc était plus riches ($63,22 \pm 6,41$ mgQE/g d'extrait) que la fraction *n*-BuOH ($21,16 \pm 12,05$ mgQE/g d'extrait).

Tableau 7.1 : Teneur en polyphénols et flavonoïdes des extraits (*n*-BuOH et EtOAc) de *C. africana*.

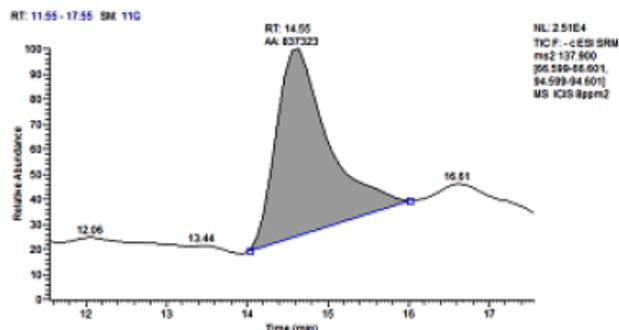
Extrait	Teneur en polyphénols (mg d'AGE/g d'extrait)	Teneur en flavonoïdes (mgQE/g d'extrait)
<i>n</i> -BuOH (BECA)	$53,03 \pm 2,50$	$21,16 \pm 12,05$
EtOAc (EAECA)	$125,24 \pm 10,14$	$63,22 \pm 6,41$

7.1.2 Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS)

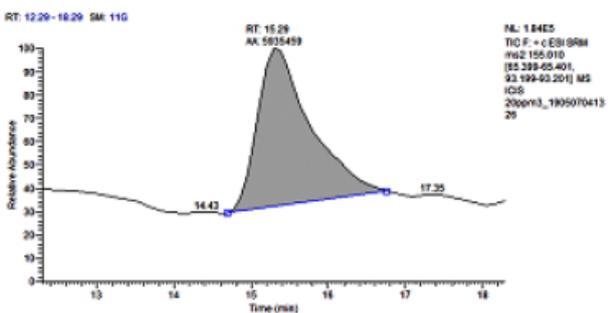
L'analyse LC-MS/MS nous a permis d'identifier 12 composés phénoliques dans l'extrait *n*-BuOH de *C. africana*. Les chromatogrammes des étalons sont présentés dans la figure 7.1, et ceux de l'extrait *n*-BuOH sont présentés dans la figure 7.2. L'acide chlorogénique ($980,98$ mg/kg d'extrait) et l'acide *p*-hydroxybenzoïque ($254,82$ mg/kg d'extrait) sont les principaux composés phénoliques de l'extrait. Les autres composés phénoliques (acide gallique, acide gentisique, acide cichorique, acide caféique, 4-hydroxybenzaldéhyde, acide rosmarinique, acide protocatéchique et trois flavonoïdes ; rutine, kaempférol, hespéridine), trouvés à des quantités plus faibles ($0,451$ - $69,190$ mg/kg d'extrait), sont répertoriés dans le tableau 7.2 Tous les composés phénoliques sont rapportés pour la première fois à partir de l'extrait *n*-BuOH de *C. africana*.



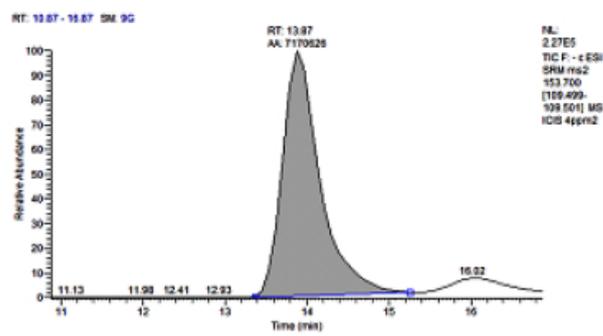
Chlorogenic acid



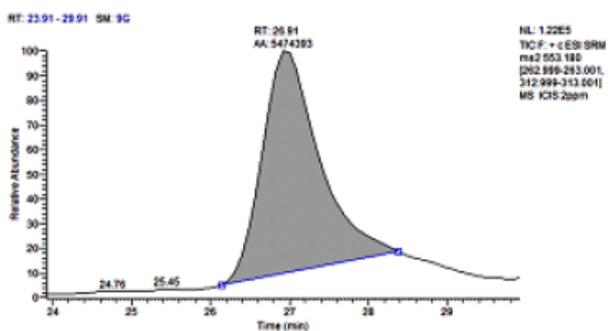
p-hydroxybenzoic acid



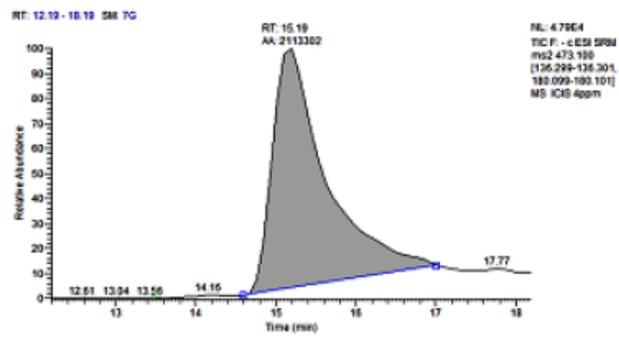
Protocatechuic acid



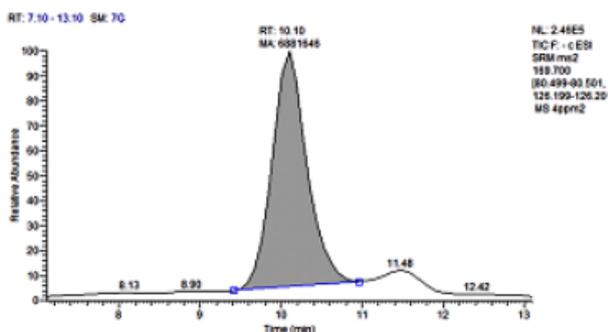
Gentisic acid



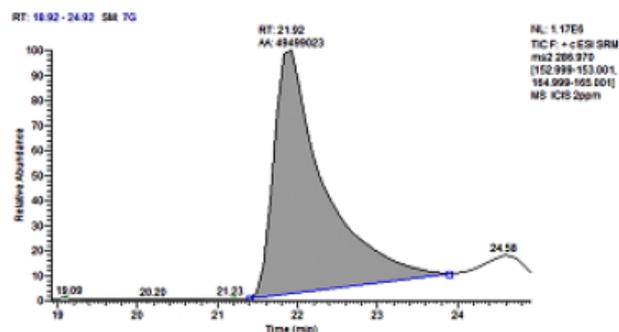
Cichonic acid



Hesperidin



Gallic acid



Kaempferol

Figure 7.1 : Chromatogrammes d'étalons de l'analyse LC-MS/MS.

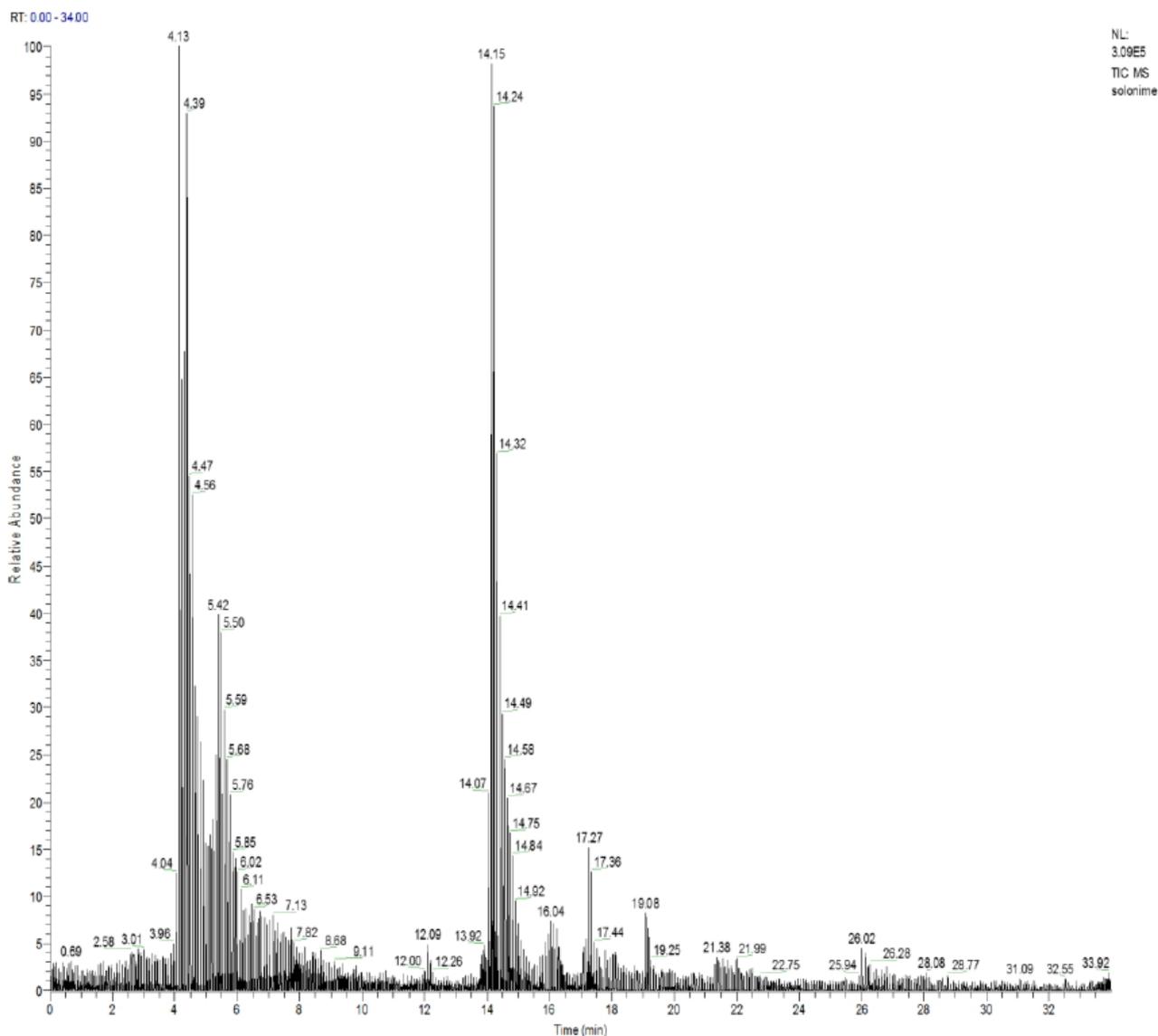


Figure 7.2 : Le profile LC-MS/MS de l'extrait *n*-BuOH de *C. africana*.

Tableau 7.2 : Le profile LC-MS/MS de l'extrait *n*-BuOH de *C. africana*.

Composé phénolique	LOD	LOQ	RT (min)	mg phénolique / Kg Extrait
L'acide chlorogénique	0,051	0,072	14,25	980,98
acide hydroxybenzoïque ^{p-}	0,243	0,519	14,64	254,824
Acide protocatéchique	0,809	1,793	15,29	69,19
Acide gentisique	0,026	0,039	13,87	65,675
Acide chicorique	0,09	0,237	15,2	46,075
Hespéridine	0,891	2,547	26,83	34,5
Acide gallique	0,058	0,091	10,1	15,415
Kaempférol	0,188	0,447	21,92	12,065
Acide caféique	0,042	0,058	15,26	9,565
4-hydroxybenzaldéhyde	0,032	0,059	15,32	4,623
Rutine	0,022	0,034	18,04	1,043
Acide rosmarinique	0,029	0,05	17,86	0,451

7.2. Évaluation de l'activité antioxydante des deux extraits AcOEt et *n*-BuOH de *C. africana*

7.2.1 L'effet scavenger du DPPH°

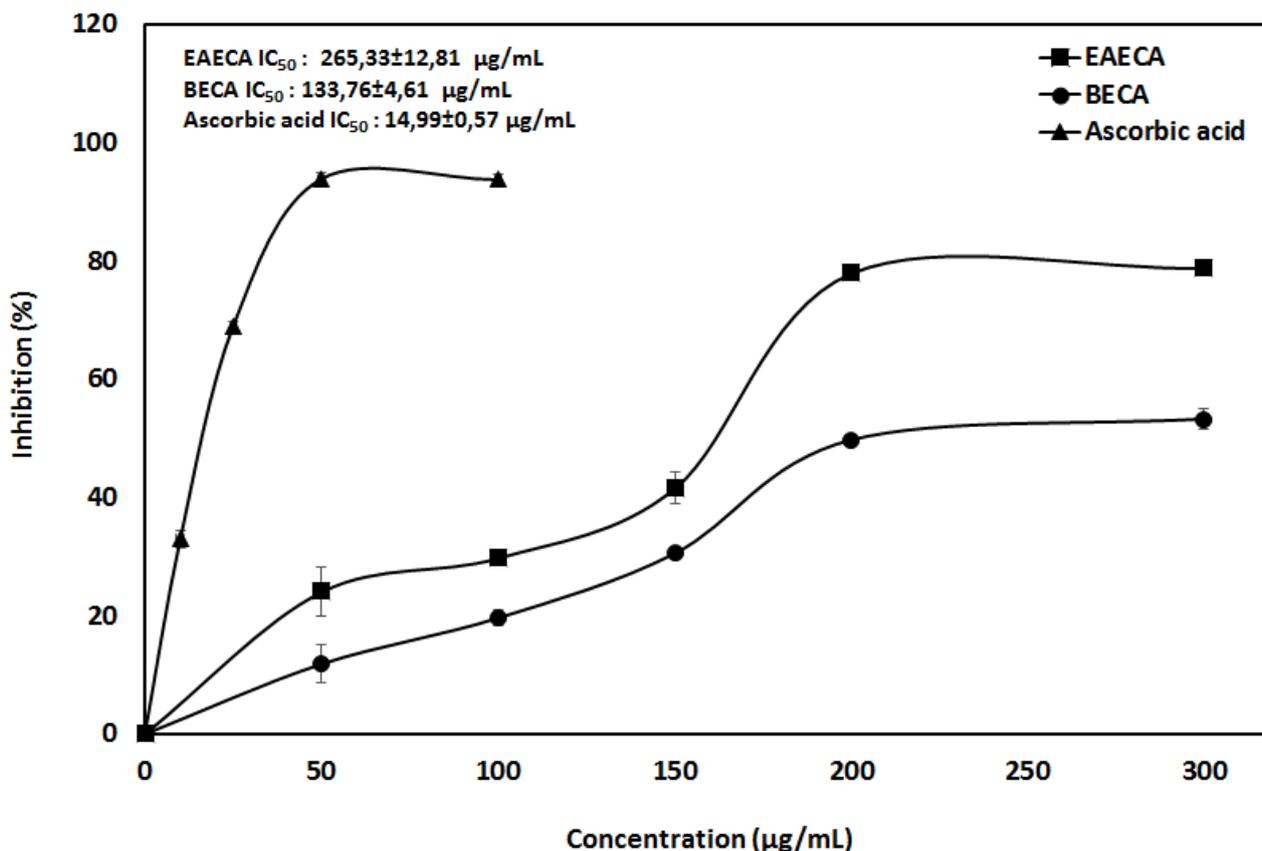


Figure 7.3 : L'activité antioxydante des deux extraits de *C. africana*: AcOEt (EAECA) et *n*-BuOH (BECA) vis-à-vis le radical DPPH°. Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n=3). P≤0.01. ** : Comparaison du groupe de l'acide ascorbique vs les groupes *n*-BuOH et EtOAc (200 mg/kg); ¥¥: Comparaison du groupe EtOAc vs le groupe *n*-BuOH.

Après 30 mn d'incubation de la solution DPPH-extrait (à différentes concentrations), la coloration violette vire vers une coloration jaune dans les concentrations élevées d'extrait. Ce changement de couleur est dû à la réduction de DPPH°, ce qui montre que les échantillons ont un effet scavenger de radical DPPH°.

Comme l'illustre la (figure 7.3), les deux extraits de *C. africana* ont montré efficacement une augmentation progressive de l'activité de piégeage de DPPH° d'une manière dépendante de la concentration.

À 300 µg/mL, l'activité de piégeage de DPPH° de la fraction EtOAc s'est révélée maximale (77,87 ± 0,44% ; IC₅₀ : 133,76 ± 4,61 µg/ml). Cet effet était plus puissant que celui de la fraction *n*-BuOH (53,13 ± 1,73% ; IC₅₀ : 265,33 ± 12,81 µg/mL). L'effet maximal du standard de référence, l'acide ascorbique a atteint son maximum à seulement 150 µg/ml (93,65 ± 0,97% ; IC₅₀ : 14,99 ± 0,57 µg/mL).

7.2.2 Le pouvoir réducteur

Dans l'analyse du pouvoir réducteur, la présence de réducteurs dans les extraits des plantes convertit la forme oxydée du fer (Fe^{+3}) en fer ferreux (Fe^{+2}). La figure 7.4 montre que les extraits de *C. africana* ont le pouvoir de réduire l'ion ferrique du ferricyanide via l'augmentation de l'absorbance proportionnellement à la concentration. La fraction *n*-BuOH était moins efficace que la fraction EtOAc qui est moins efficace par rapport à des mêmes concentrations d'acide ascorbique.

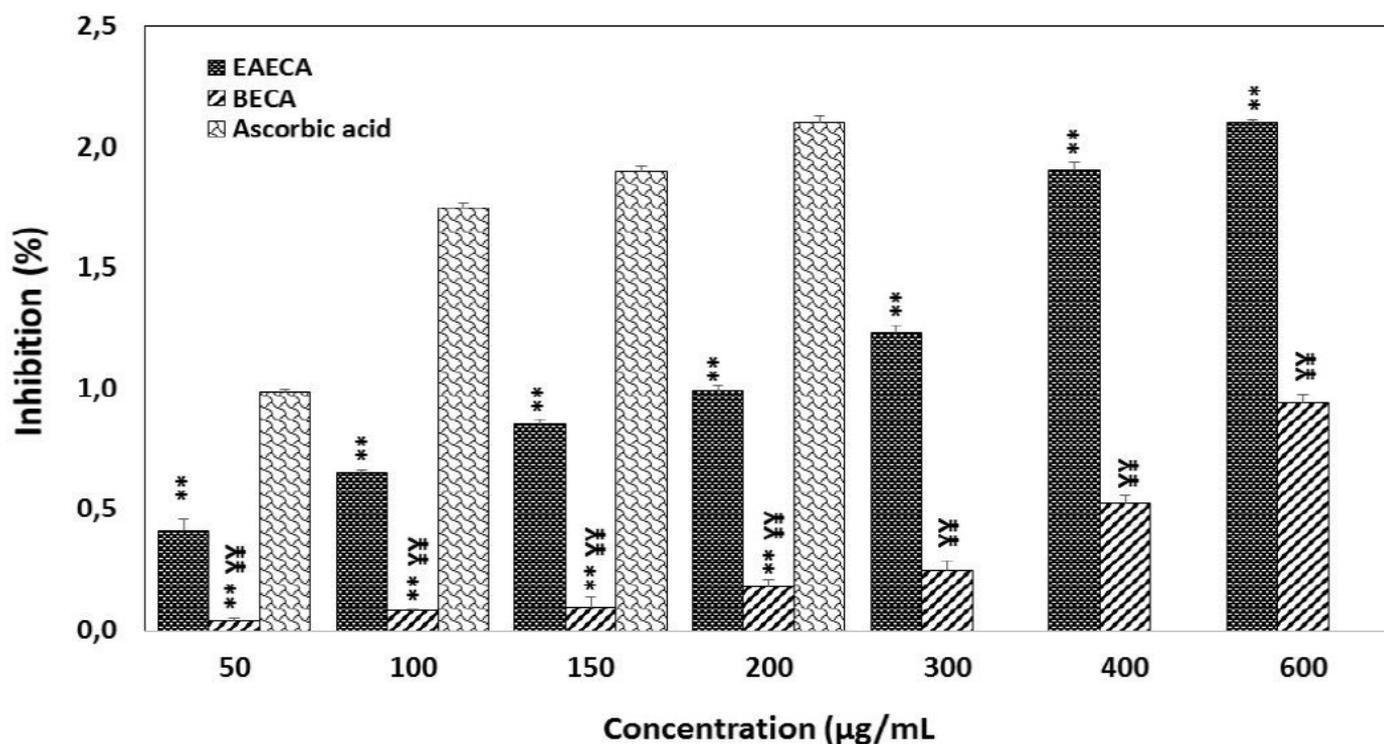


Figure 7.4 : Pouvoir réducteur des extraits AcOEt (EAECA) et *n*-BuOH (BECA) de *C. africana*. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3). $\text{P} < 0.01$. ** : Comparaison du groupe de l'acide ascorbique vs les groupes *n*-BuOH et EtOAc (200 mg / kg) ; ¥¥ : Comparaison du groupe EtOAc vs le groupe *n*-BuOH.

7.2.3 Inhibition de la peroxydation lipidique (LPO) induite par le système Fe^{2+} /acide ascorbique

L'extrait EtOAc (IC_{50} : $136,70 \pm 2,03$) s'est avéré être un meilleur inhibiteur de la peroxydation lipidique que l'extrait *n*-BuOH (IC_{50} : $332,81 \pm 25,06$).

La figure 7.5 a montré que les extraits de *C. africana* ont réduit la formation de la MDA d'une manière dépendante de la concentration. À 600 µg/ml, les deux fractions ont manifesté une inhibition de l'ordre suivant : $91,59 \pm 4,109$ % (EtOAc), et $56,99 \pm 7,197$ % (*n*-BuOH).

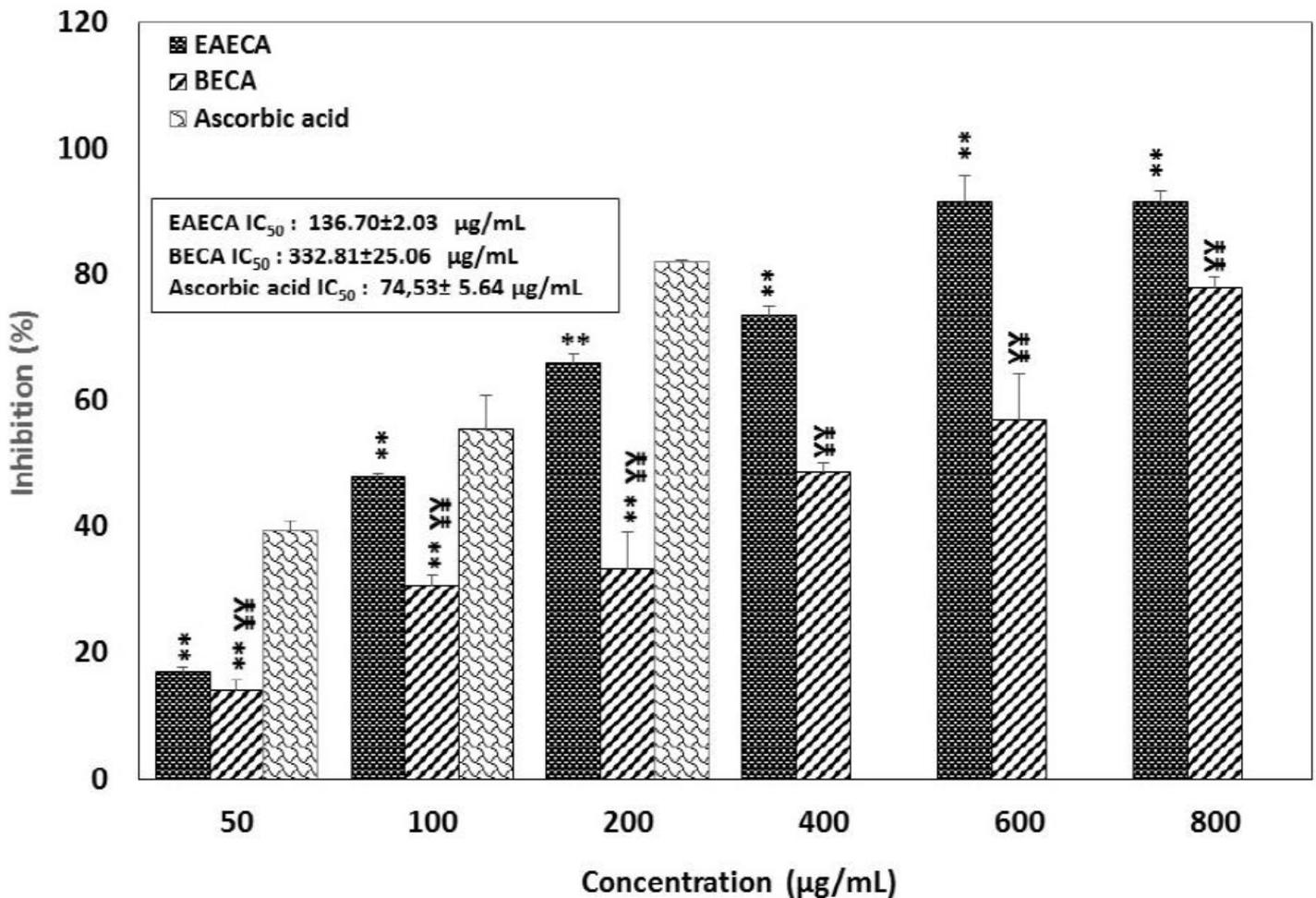


Figure 7.5: Le pouvoir antiperoxidative des extraits AcOEt (EAECA) et *n*-BuOH (BECA) de *C. africana*. Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n=3). †0.01. ** : Comparaison du groupe de l'acide ascorbique vs les groupes *n*-BuOH et EtOAc (200 mg/kg) ; ¥¥ : Comparaison du groupe EtOAc vs le groupe *n*-BuOH.

7.3 Évaluation de l'activité anti-inflammatoire des deux extraits AcOEt et *n*-BuOH de *C. africana*

7.3.1 Test de l'activité de piégeage de l'oxyde nitrique (NO) *in vitro*

La capacité scavenger est déterminée par la diminution de l'absorbance à 546 nm. Les résultats illustrent l'activité anti-radicalaire vis-à-vis du piégeage du radical libre NO (la figure 7.6). L'inhibition maximale de NO a été observée avec l'extrait *n*-BuOH à une concentration maximale de 400 µg/ml (84,7 ± 4,126). L'IC₅₀ de l'extrait *n*-BuOH a été enregistrée à 140,90 ± 6,02 µg/mL, tandis que celle de l'extrait EtOAc a été enregistrée à 655,10 ± 75,28 µg/ml, et celle du BHA à 52,73 ± 5,72 µg/ml.

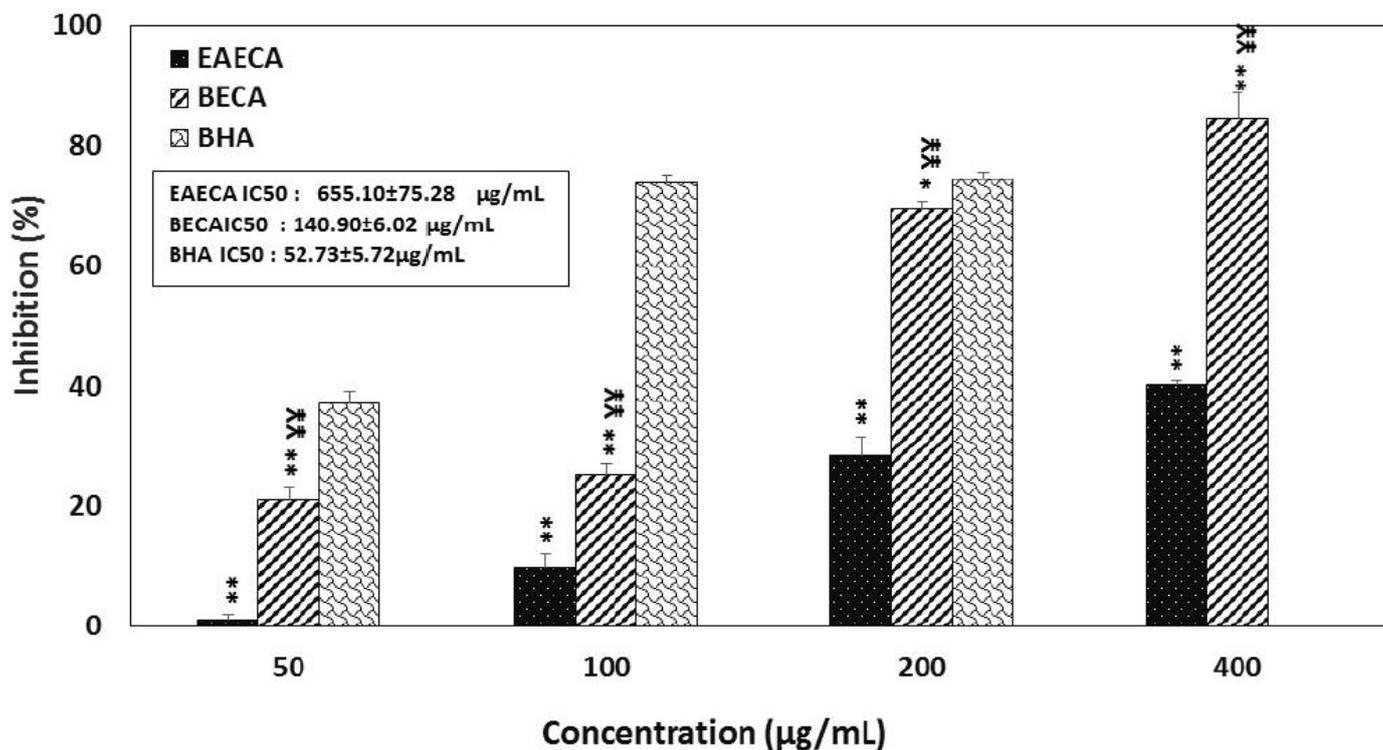


Figure 7.6: L'effet scavenger des extraits AcOEt (EAECA) et *n*-BuOH (BECA) de *C. africana* contre le radical (NO). Chaque point représente la moyenne \pm SD (n=3). $P \leq 0.01$. ** : Comparaison du groupe de BHA vs les groupes *n*-BuOH et EtOAc (200 mg/kg) ; ¥¥ : Comparaison du groupe EtOAc vs le groupe *n*-BuOH.

7.3.2 Modèle d'inflammation aiguë : Œdème induit par la carragénine *in vivo*

7.3.2.1 Détermination du volume de l'œdème de la patte induit par la carragénine

Dans le modèle expérimental d'inflammation de la carragénine, les volumes d'œdème de la patte ont été augmentés entre la première heure ($5,278 \pm 0,08$ mm) et la troisième heure ($6,878 \pm 0,11$ mm) après l'injection de la carragénine. La figure 7.7 montre que l'extrait *n*-BuOH de *C. africana* à 200 mg/kg présente une activité anti-inflammatoire significative ($p \leq 0,01$) ; il réduit significativement (40,72 % à 48,45 %) le gonflement à la fois au début (1^{ère} et 3^{ème} heure), et dans la phase tardive (6 heures) de l'œdème provoqué par la carragénine. L'inhibition la plus élevée du gonflement (48,45 %) a été enregistrée pour l'extrait *n*-BuOH au bout de 6 heures. Cet effet est clairement comparable à celui du diclofénac-sodium (10 mg/kg), qui se révèle inhibé à 53,75%.

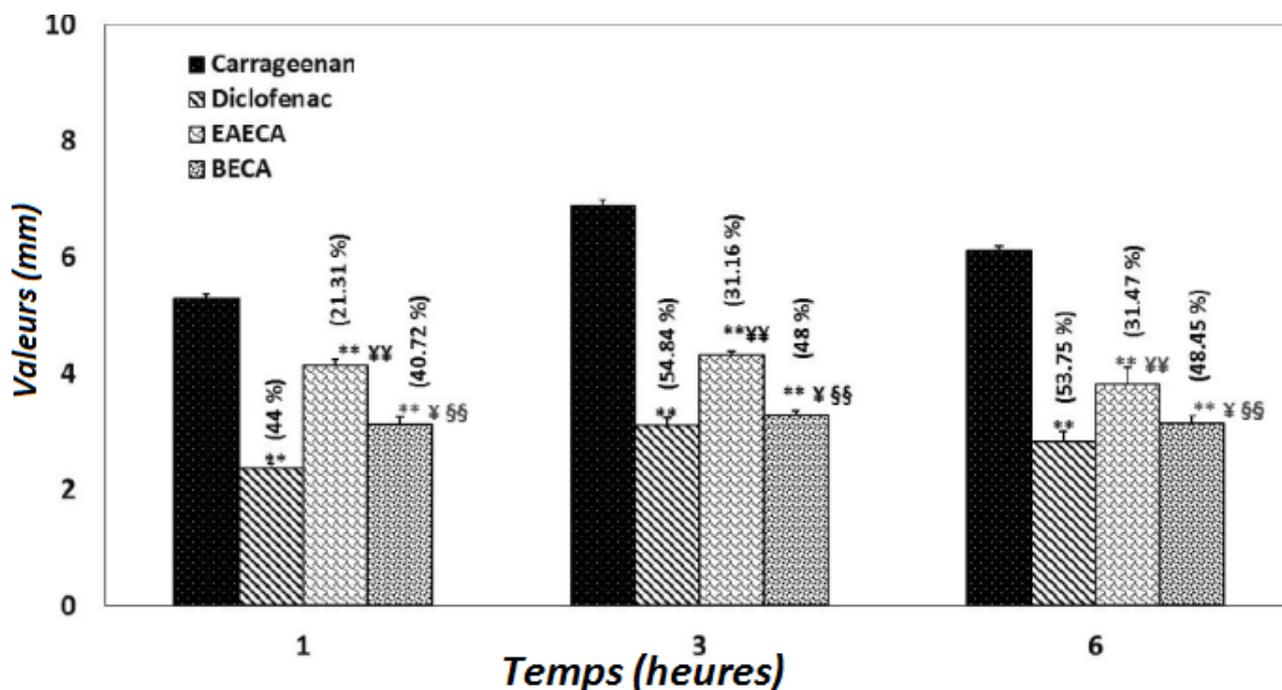


Figure 7.7: Effet anti-inflammatoire des extraits AcOEt (EAECA) et *n*-BuOH (BECA) de *C. africana* sur l'oedème de la patte du rat induit par la carragénine. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=5). $P \leq 0,01$. ** : Comparaison du groupe carragénine vs groupes Diclofénac-sodium (10 mg / kg), *n*-BuOH et EtOAc (200 mg/kg) ; ¥¥ : Comparaison du groupe Diclofénac (10 mg/kg) vs groupes *n*-BuOH et EtOAc (200 mg/kg) ; §§ : Comparaison du groupe EtOAc vs groupe *n*-BuOH. Les valeurs entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

7.3.2.2 Activité de la myéloperoxydase (MPO) et taux de malondialdéhyde (MDA) dans les tissus des pattes

Les niveaux de MDA et MPO ont été testés après 6 heures de l'injection de la carragénine. Les effets des phases *n*-BuOH et EtOAc sur les niveaux de MDA et MPO sont illustrés dans la figure 7.8. Dans le groupe carragénine, nous avons noté une augmentation très significative des taux de MDA ($13,9 \pm 0,9$ nmol/mg de tissu) et de MPO ($5,1 \pm 0,8$ U/mg de tissu) par rapport au groupe témoin. Les deux phases *n*-BuOH et EtOAc (200 mg/kg) ainsi que le diclofinac-sodium (10 mg/kg) ont diminué, d'une manière hautement significative, les taux du MDA à un pourcentage de 65,58 %, 48,05 % et 79,85 % respectivement, et l'activité de la MPO dans le tissu de la patte de rat à un pourcentage de 58,82 %, 48,52 % et 81,76% respectivement.

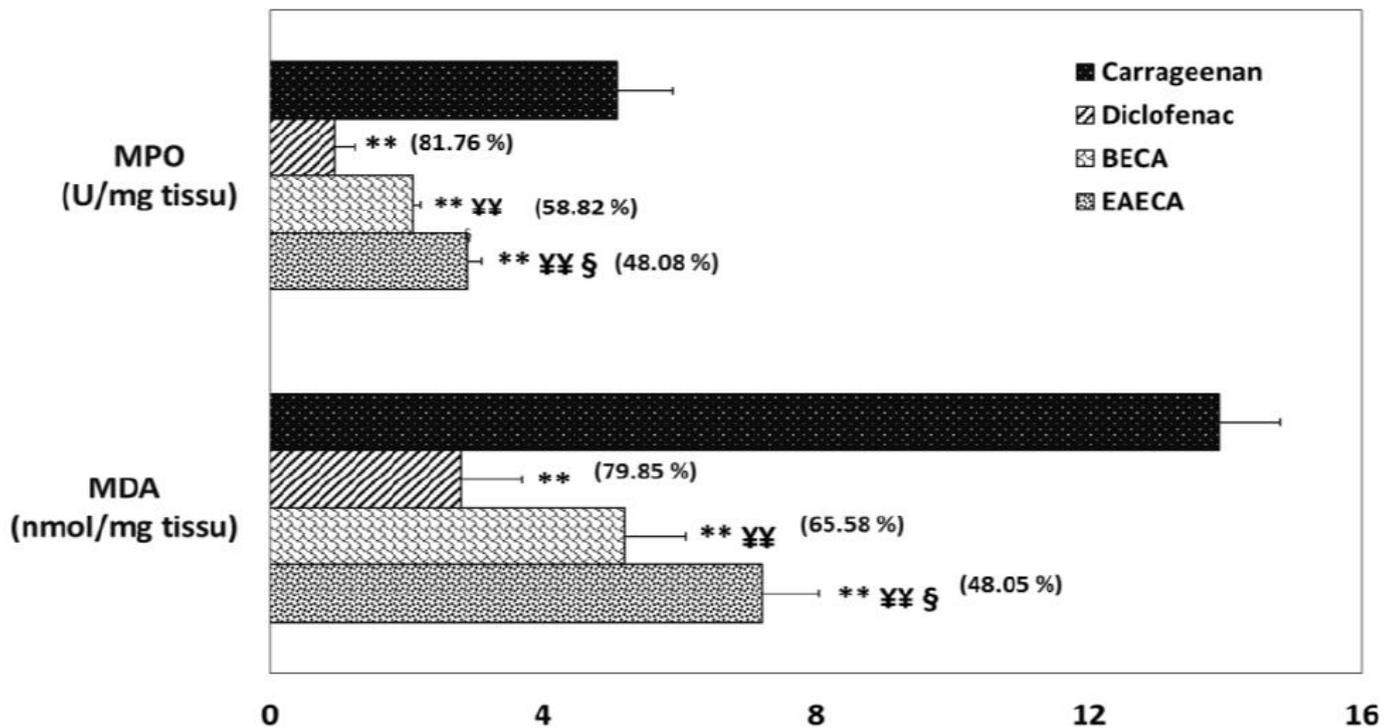


Figure 7.8 : Effet anti-inflammatoire des extraits AcOEt (EAECA) et *n*-BuOH (BECA) de *C. africana* sur la production du MDA et l'activité de la MPO dans les tissus des pattes des rats. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=5).001. ** : Comparaison du groupe carragénine vs groupes Diclofénac-sodium (10 mg / kg), *n*-BuOH et EtOAc (200 mg / kg) ; ¥¥ : Comparaison du groupe Diclofénac (10 mg/kg) vs groupes *n*-BuOH et EtOAc (200 mg/kg) ; §§ : Comparaison du groupe EtOAc vs groupe *n*-BuOH. Les valeurs entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

7.4 Évaluation de l'activité neuroprotective de l'extrait *n*-BuOH de *C. africana* *in vivo*

7.4.1 Testes comportementaux

7.4.1.1 Effet de l'extrait *n*-BuOH sur la catalepsie induite par la Roténone

Le comportement cataleptique des animaux traités par la Roténone (groupe toxique) s'est révélé augmenter de manière significative chaque semaine (le temps de rétention moyen est 16 s) par rapport au groupe témoin qui a enregistré un score moyen de 2 s. Le co-traitement avec l'extrait *n*-BuOH a empêché l'augmentation du comportement cataleptique (66,09 %) par rapport aux animaux traités par la ROT seule. Le temps de rétention des animaux sur la barre s'est avéré réduit considérablement dans le lot traité par la L-Dopa (86,93 %).

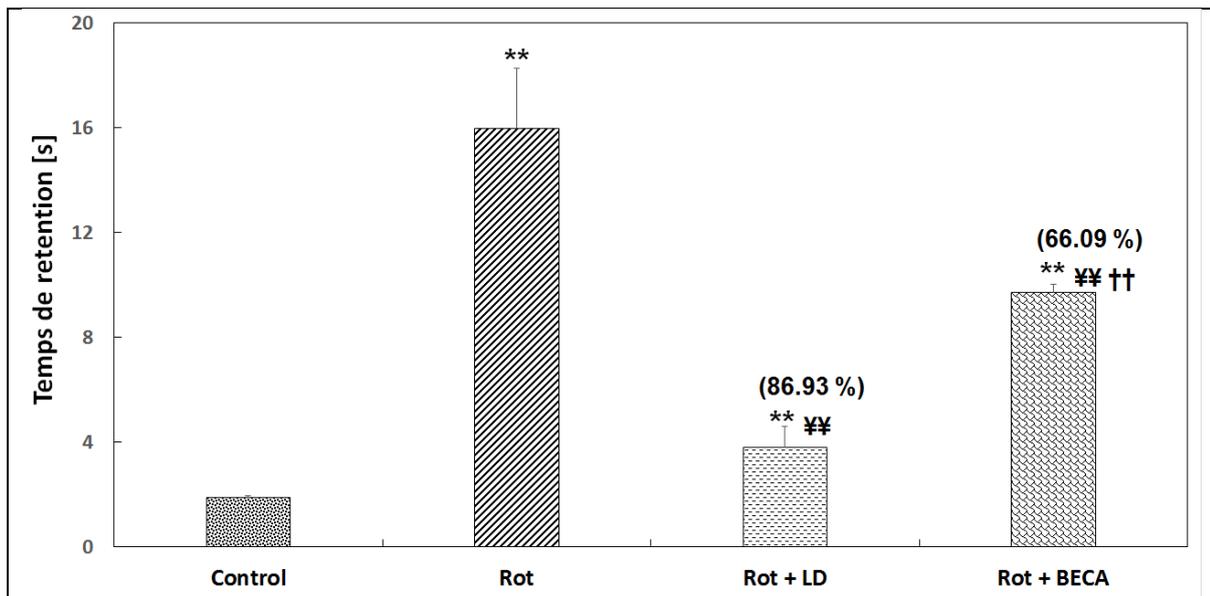


Figure 7.9 : Effet de l'extrait *n*-BuOH (BECA) (200 mg / kg) sur le temps de latence (test de catalepsie) durant 21 jours. Chaque valeur est la moyenne \pm SD (n = 8) \bar{P} 0,01 et $P \leq 0,01$; **: comparaison au groupe contrôle ; ¥¥: comparaison au groupe traité par la roténone ; †† : comparaison au groupe ROT + L-Dopa

7.4.1.2 Analyse générale des mouvements

Le traitement par la ROT seule a entraîné un début de décroissance des mouvements en une semaine avec une augmentation significative du score de l'échelle de Ludolph tout au long de l'étude. Le traitement par la phase *n*-BuOH de la plante *C. africana* a nettement ralenti l'augmentation du score de Ludolph (59,52 %) (Figure 7.10). Le score du groupe témoin était presque nul.

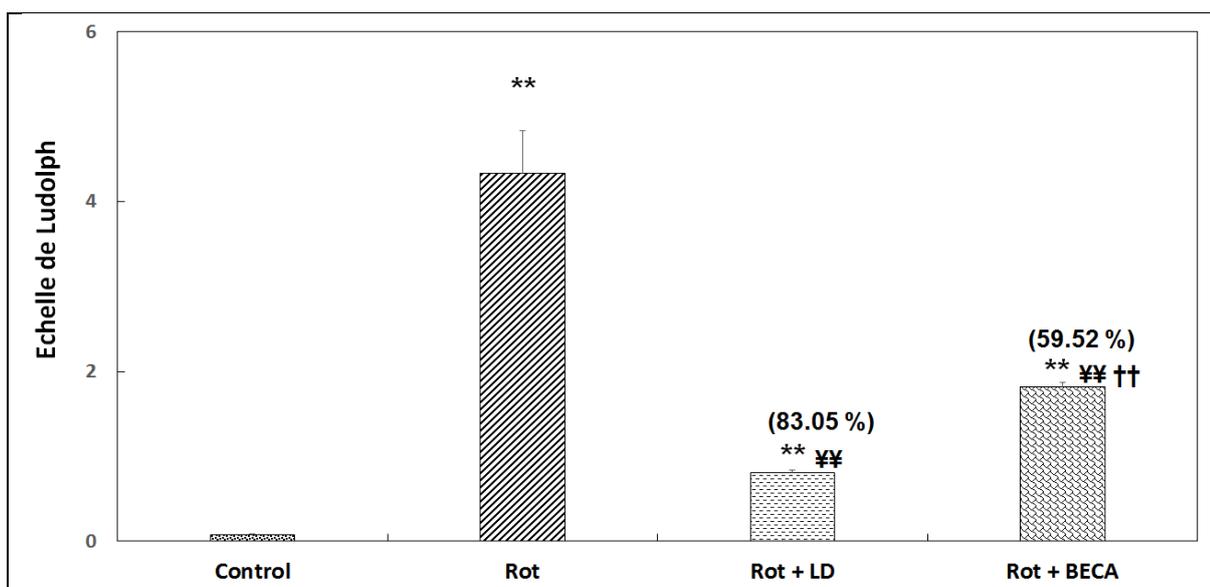


Figure 7.10 : Effet de l'extrait *n*-BuOH (BECA) (200 mg / kg) sur les mouvements du rat

(score de l'échelle de Ludolph). Chaque valeur est la moyenne \pm SD (n = 8) $\text{P} < 0,01$; **: comparaison au groupe contrôle ; ¥¥: comparaison au groupe traité par la roténone ; †† : comparaison entre groupe ROT + L-Dopa

7.4.2 Effet de l'extrait *n*-BuOH de *C. africana* sur les marqueurs neurochimiques

Le traitement des rats par la ROT a provoqué clairement une déplétion significative du taux de la dopamine cérébrale ($45,08 \pm 4,8$ ng/mg de tissu ; $P < 0,01$) par rapport à celui du groupe témoin ($65,7 \pm 5,3$ ng/mg de tissu) (figure 7.11), et a augmenté le niveau de glutamate ($189,73 \pm 15$ ng/mg de tissu; $P < 0,01$) dans les tissus cérébraux par rapport au groupe témoin ($85,61 \pm 12$ ng/mg de tissu) (figure 7.11). Comparé au groupe ROT, le co-traitement de la ROT avec l'extrait *n*-BuOH de *C. africana* a entraîné une augmentation significative du niveau de la DA (63,62 % ; $P < 0,01$; figure 7.11) et une diminution du glutamate (79,28 % ; $P < 0,01$; figure 7.11). L'administration de la L-Dopa a permis de préserver le niveau de la DA et du glutamate chez les rats traités par la ROT (73,95 % et 86,36 % respectivement).

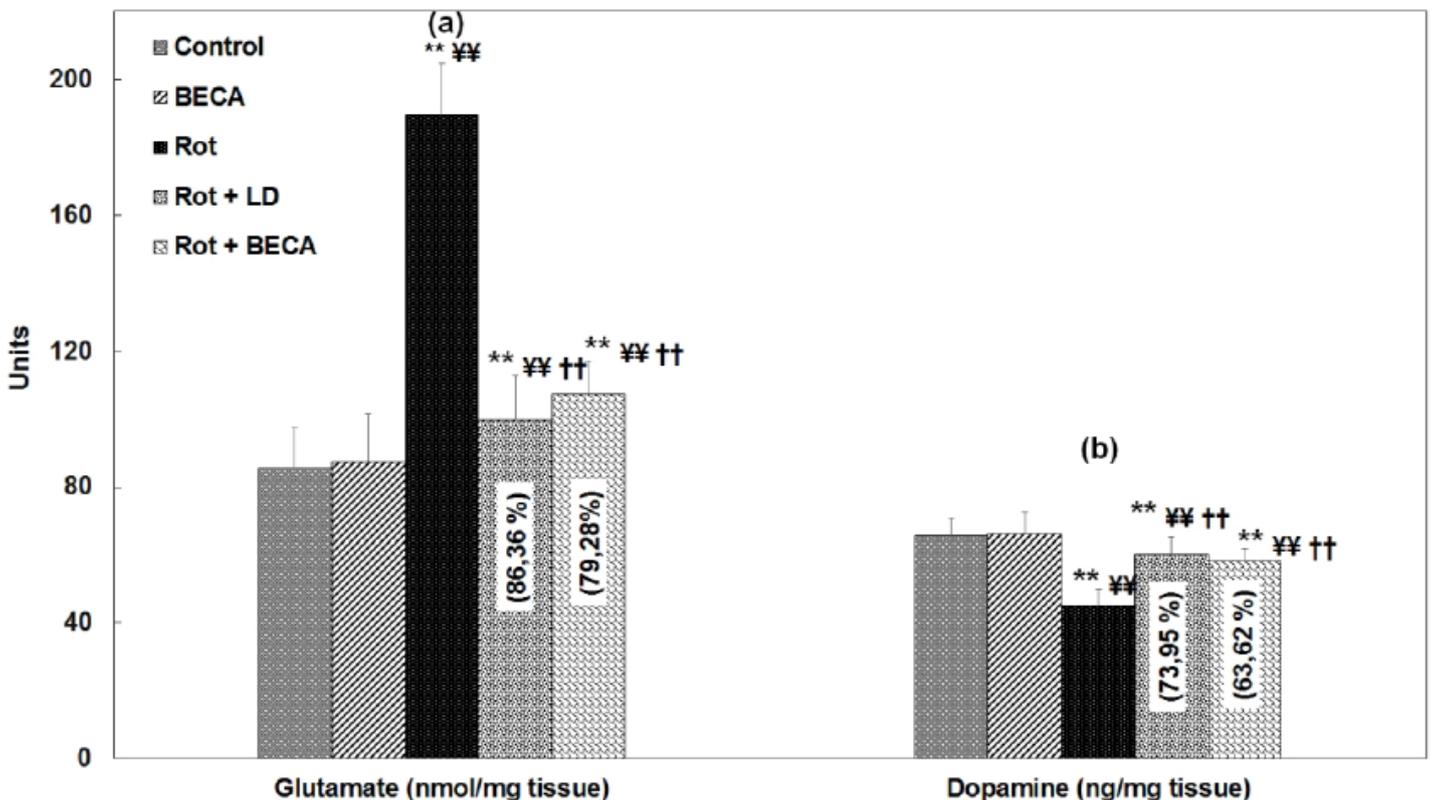


Figure 7.11 : L'effet de l'extrait *n*-BuOH (BECA) de *C. africana* (200 mg / Kg) sur les niveaux des marqueurs neurochimiques, (a, glutamate) (b, dopamine) dans les cerveaux des rats traités par la ROT (1 mg/kg). Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=8). ** : Groupe ROT vs groupe

témoin ($P < 0,01$) ; ¥¥ : Groupe ROT vs groupe ROT + LD ($P < 0,01$) ; †† : Groupe ROT vs groupe ROT + *n*-BuOH ($P < 0,01$). Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection. Le % de protection est calculé comme suit : $100 \times (\text{valeur de ROT}) - \text{valeur d'échantillon} / (\text{valeur de ROT}) - \text{valeur de contrôle}$.

7.4.3 Évaluation du statut oxydant cytosolique

7.4.3.1 La peroxydation lipidique et l'activité de la paraoxonase 1 cérébrale (PON1)

Dans notre étude, l'administration de ROT a provoqué une inhibition significative ($P < 0,01$) de l'activité PON1 cérébrale ($28,13 \pm 2,5$ versus le groupe témoin : $58,4 \pm 4,1$ kU/g tissue) (Figure 7.12 (b)) en association avec une peroxydation lipidique accrue (MDA) ($6,87 \pm 0,9$ versus le groupe témoin : $3,53 \pm 0,7$ nmol / mg de protéines) (Figure 7.12 (a)). Cette variation pourrait être expliquée par la génération des ERO suite à l'injection de la ROT. Le co-traitement avec l'extrait *n*-BuOH de *C. africana* (200 mg/kg) par voie orale a diminué le taux de MDA (58,91 %) et a restauré significativement l'activité de la PON1 (65,67 %, $P < 0,01$).

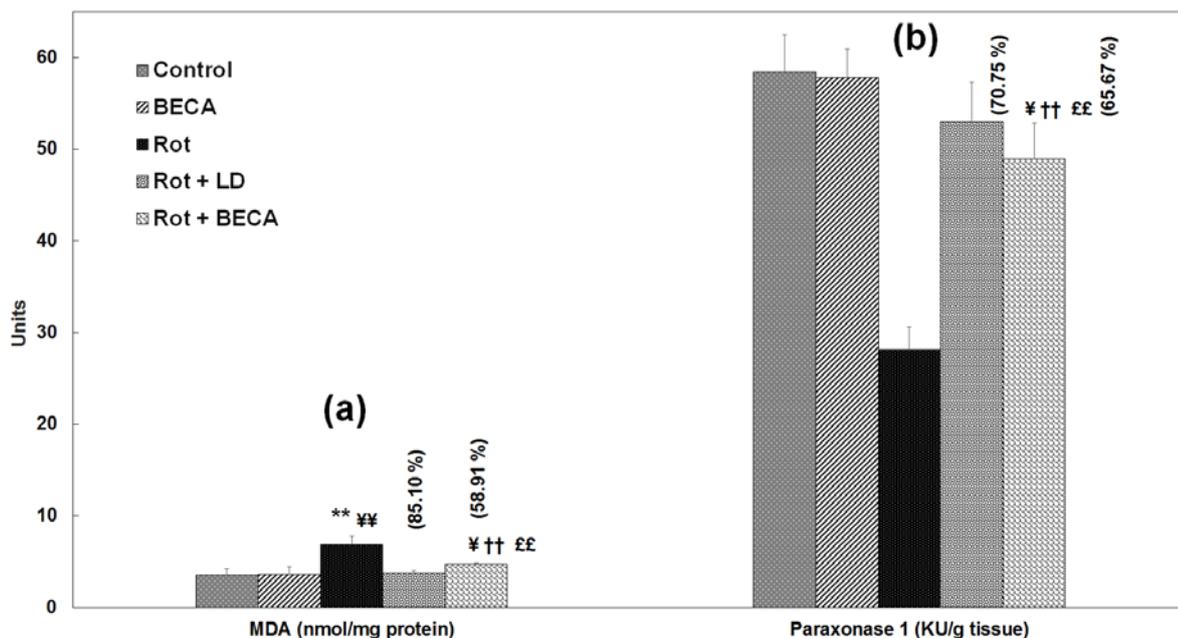
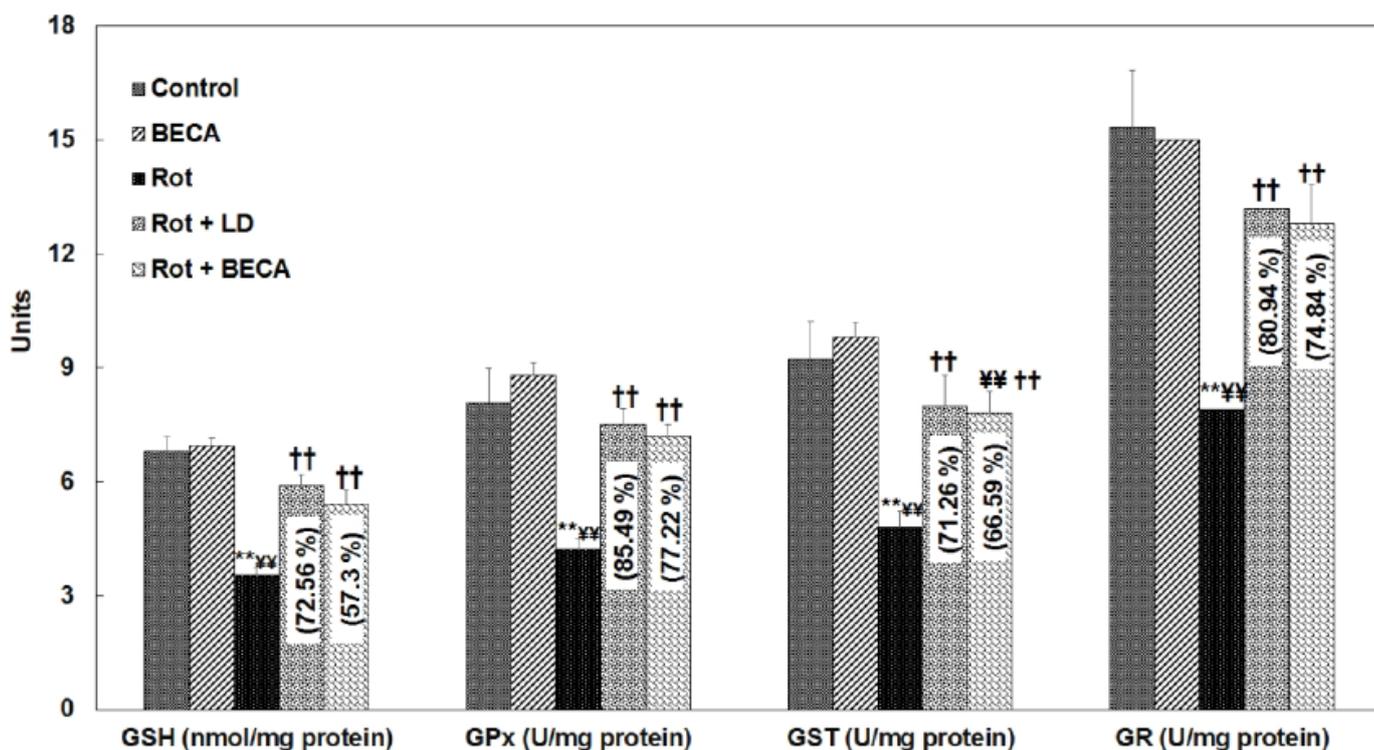


Figure 7.12 : Influence de l'administration de l'extrait *n*-BuOH de *C. africana* (BECA) (200 mg/kg) sur le taux de MDA et PON1 dans les cerveaux des rats traités par la ROT (1 mg/kg).

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ($n=8$). ** : Groupe ROT vs groupes témoins ($P < 0,01$) ; ¥¥ : Groupe ROT vs groupe ROT + LD ($P < 0,01$) ; †† : Groupe ROT vs groupe ROT + *n*-BuOH ($P < 0,01$). Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection. Le % de protection est calculé comme suit : $100 \times (\text{valeur de ROT}) - \text{valeur d'échantillon} / (\text{valeur de ROT}) - \text{valeur de contrôle}$.

7.4.3.2 Activité enzymatique du système glutathion cytosolique

Le taux du GSH et l'activité enzymatique des GPx, GR et GST au niveau du cerveau ont diminué chez le groupe traité par la ROT comparativement aux témoins. Les résultats sont présentés dans la figure 7.13. Le co-traitement des rats avec l'extrait *n*-BuOH de *C. africana* a corrigé d'une manière efficace le taux du GSH (57,3 %) et a restauré l'activité des enzymes du système GSH (GPx : 77,71 %, GR : 74,84 % et GST : 66,39 %) (Figure 7.13). Le rétablissement des paramètres de ce système antioxydant par l'extrait *n*-BuOH (200 mg/kg) est semblable à celui observé dans le cas du traitement des rats par la L-Dopa (LD) (GSH : 72,59%, GPx : 85,49 %, GR : 80,94 % et GST :



71,76 %).

Figure 7.13 : Effet de l'extrait *n*-BuOH de *C. africana* (BECA) (200 mg/kg) sur le système glutathion cytosolique dans les cerveaux des rats traités par la ROT (1 mg/kg).

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=8). ** : Groupe ROT vs groupes témoins (P < 0,01) ; ¥¥ : Groupe ROT vs groupe ROT + LD (P < 0,01) ; †† : Groupe ROT vs groupe ROT + *n*-BuOH (P < 0,01). Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition. Le % de protection est calculé comme suit : $100 \times (\text{valeur de ROT} - \text{valeur d'échantillon}) / (\text{valeur de ROT} - \text{valeur de contrôle})$.

7.4.3.3 Évaluation du statut oxydatif mitochondrial

Le statut oxydant mitochondrial a été évalué au niveau des mitochondries isolées à partir des cerveaux des rats traités avec l'extrait *n*-BuOH (200 mg/kg) et la ROT (1 mg/kg). Les rats traités

par la ROT seule ont présenté une déplétion du taux de GSH mitochondrial qui a été associée à une diminution significative des enzymes antioxydantes (SOD, GPx et GST) et à une augmentation significative du taux du marqueur de la peroxydation lipidique (MDA). Le co-traitement des rats avec l'extrait *n*-BuOH (200 mg/kg) a restauré significativement le taux de la GSH [55,99 %, Figure 7.14 (a)], a rétabli les activités des enzymes du système antioxydant [SOD : 67,94 %, GPx : 77,14 %, GST : 54,79 % ; Figure 7.14 (b)] et a réduit le taux de la MDA [83 % Figure 7.14 (a)]. Alors que, le co-traitement des rats avec la L-Dopa a donné les résultats suivants : restauration du taux du GSH (82,64 %) et de l'activité de la GPx (88,5 %), de la SOD (84,32 %) et de la GST (75,34 %), et a conduit à une réduction de la MDA (88 %) (Figure 7.14)].

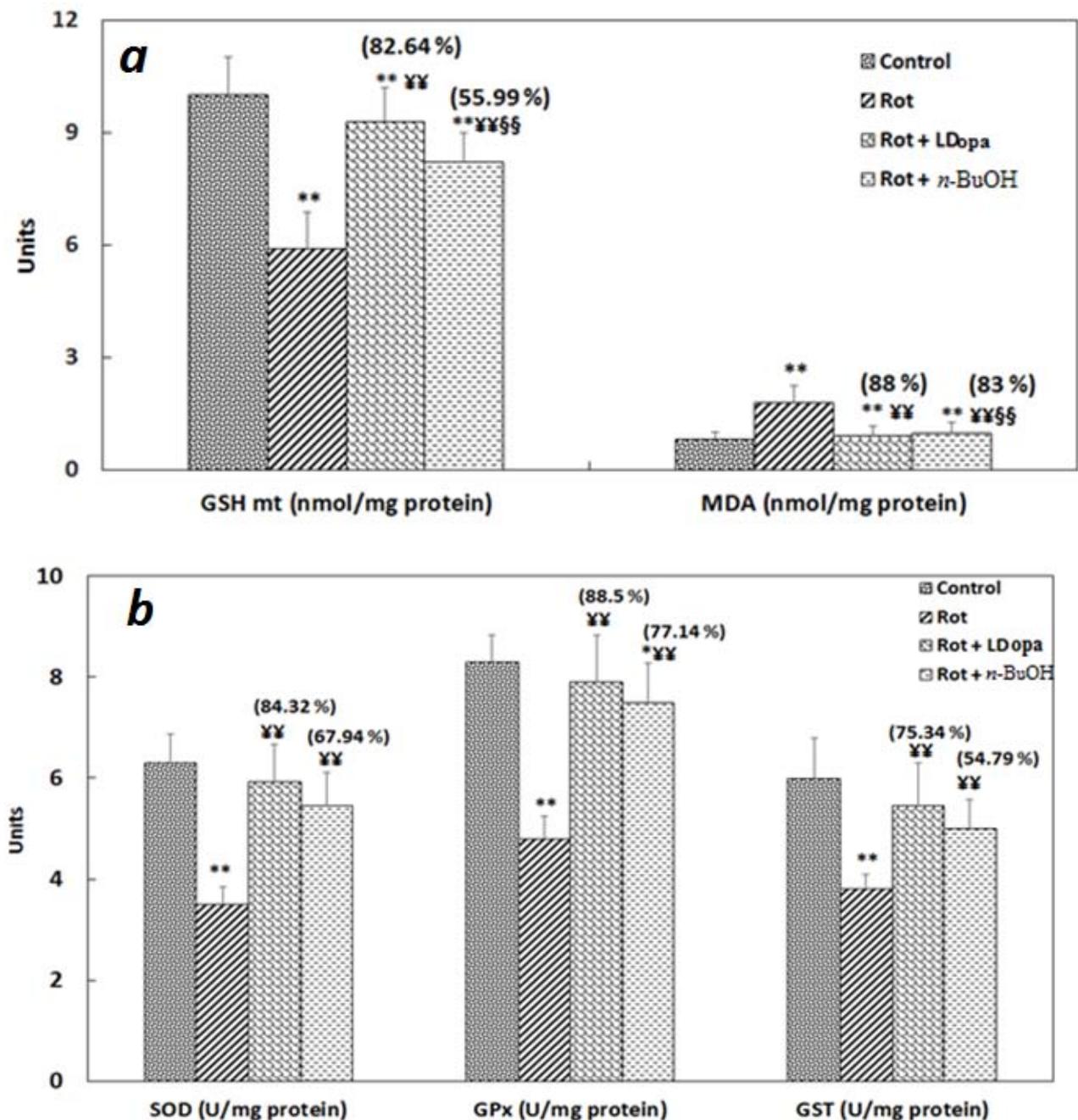


Figure 7.14 (a, b) : L'effet de l'extrait *n*-BuOH de *C. africana* (BECA) (200 mg/kg) sur la variation des taux de la MDA et du GSH (a), et sur les enzymes antioxydantes mitochondriales (b) des cellules de cerveau des rats traités par la ROT (1 mg/kg).

7.4.4 Évaluation du dysfonctionnement mitochondrial

Les résultats montrent que le traitement par la ROT seule inhibe l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale par rapport à celui des rats témoins. Le co-traitement avec l'extrait *n*-BuOH a significativement ($P < 0,01$) restauré l'activité du complexe I (65,41 %) par rapport au groupe traité par la ROT seule. Cependant, le co-traitement avec L-Dopa a augmenté l'activité du complexe I par un pourcentage de 89,47 % (Figure 7.15).

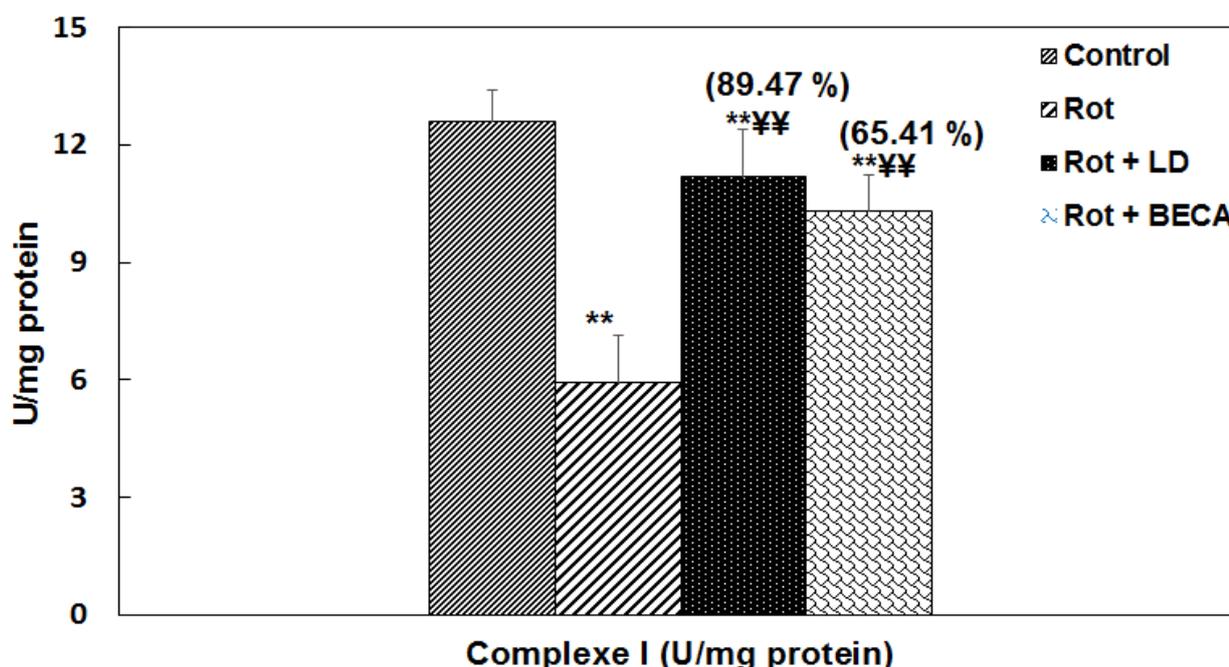


Figure 7.15 : L'effet de l'extrait *n*-BuOH de *C. africana* (200 mg/kg) sur l'activité du complexe I dans les cellules de cerveau des rats traités par la ROT (1 mg/kg).

7.4.5 Évaluation des marqueurs apoptotiques

Les rats traités par la ROT ont montré une augmentation significative ($P < 0,05$) des taux des marqueurs Bax et caspase-3, et une diminution significative ($P < 0,05$) des taux du marqueur Bcl-2 par rapport aux rats témoins. Le co-traitement avec l'extrait *n*-BuOH a réduit les niveaux du Bax pro-apoptiques (83 %) et caspase-3 (73,46 %), et a augmenté de manière significative les niveaux de Bcl-2 (61,64 %). Cependant, le co-traitement avec la L-Dopa (LD) a restauré les niveaux des protéines Bax pro-apoptiques, caspase-3 et Bcl-2 (88 %; 89,26 %; 84,40 % respectivement).

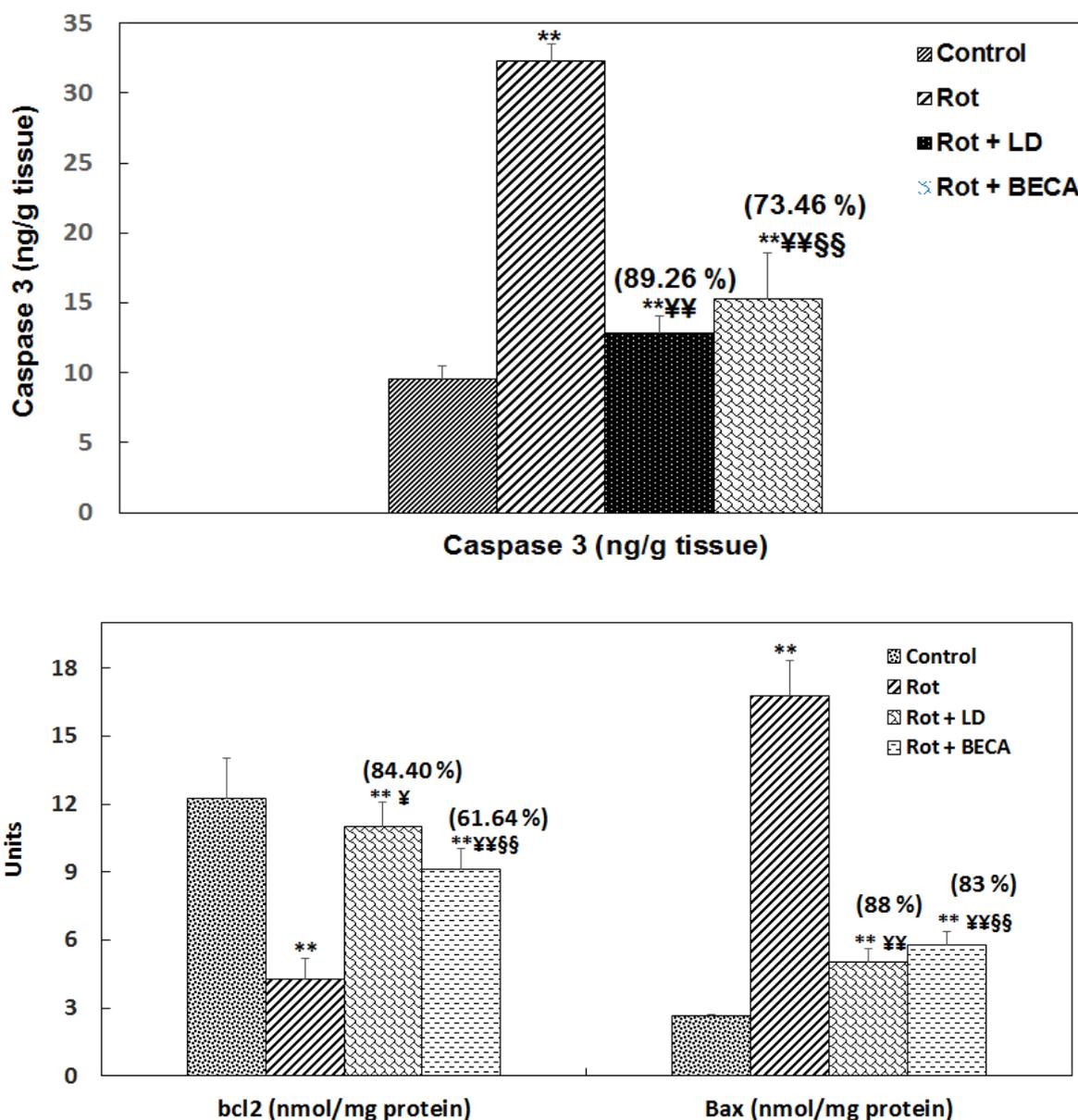


Figure 7.16 : L'effet de l'extrait *n*-BuOH de *C. africana* (BECA) (200 mg/kg) sur les marqueures Bax, caspase-3 et Bcl-2 dans les cellules de cerveau des rats traités par la ROT (1 mg/kg).

7.4.6 Évaluation des marqueurs neuroinflammatoires

Dans l'étude actuelle, les animaux traités par la ROT ont montré une augmentation de la neuroinflammation qui est déclenchée et entretenue par divers mécanismes, tels que l'augmentation des taux du TNF- α (4,75 fois), du NO (2,22 fois) et de la MPO (2,97 fois) dans les cerveaux des rats figure 7.17 (a, b). Le co-traitement avec l'extrait *n*-BuOH a significativement ($P < 0,01$) atténué la génération de ces médiateurs pro-inflammatoires (TNF- α : 71,48 %), (NO : 77,43 %) et (MPO : 75,12 %). Les résultats obtenus par l'extrait sont semblables aux résultats du co-traitement avec la L-Dopa ou LD (TNF- α : 80,02 %), (NO : 83,18 %) et (MPO : 82,43 %) (Figure 7.17).

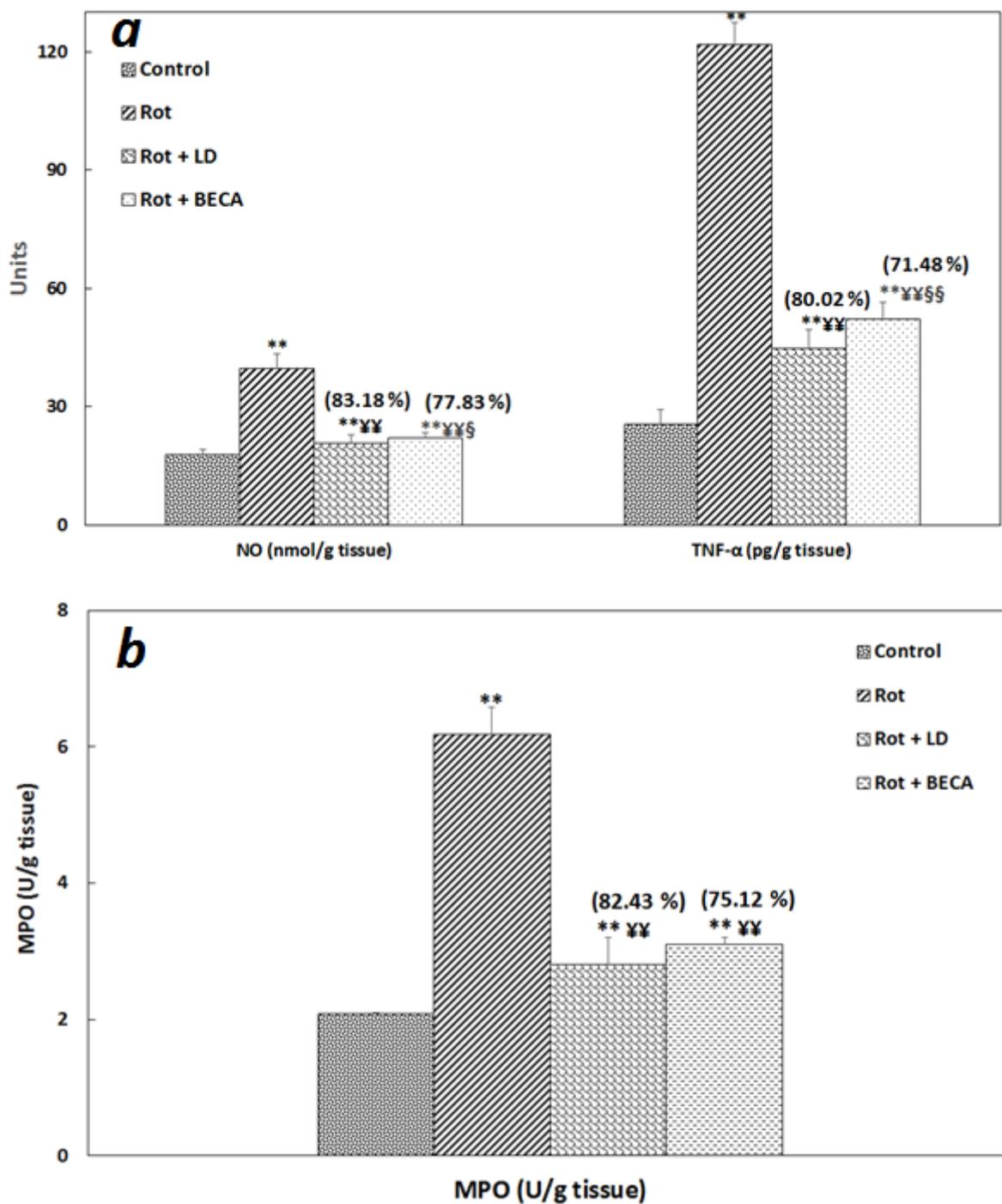
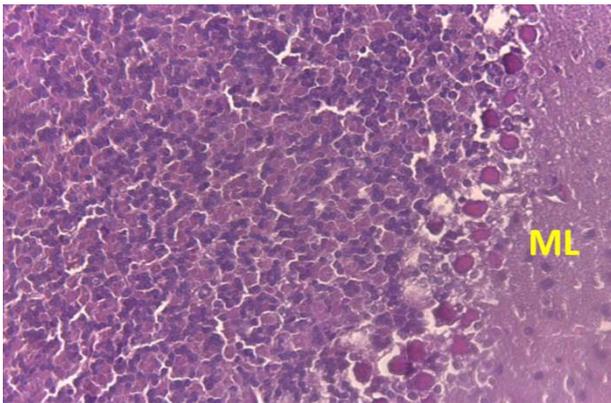
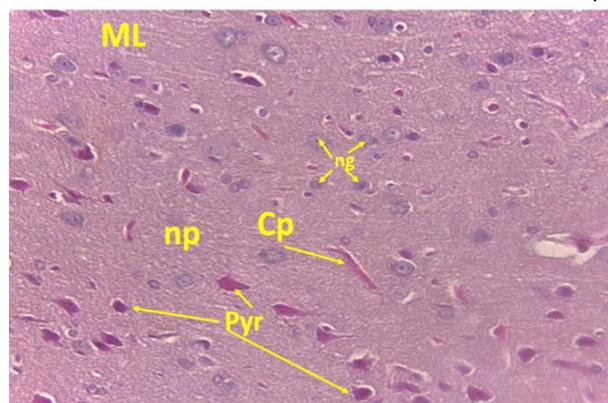


Figure 7.17 (a, b) : L'effet de l'extrait *n*-BuOH de *C.africana* (BECA) (200 mg/kg) sur la variation des taux des médiateurs pro-inflammatoires (TNF- α , NO (a) et MPO (b)) dans les cerveaux des rats traités par la ROT (1 mg/kg).

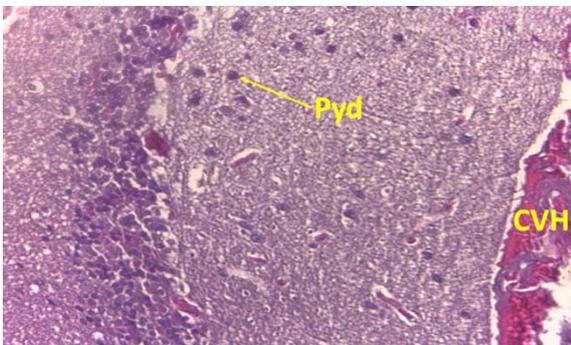
7.4.7 Analyse histopathologique



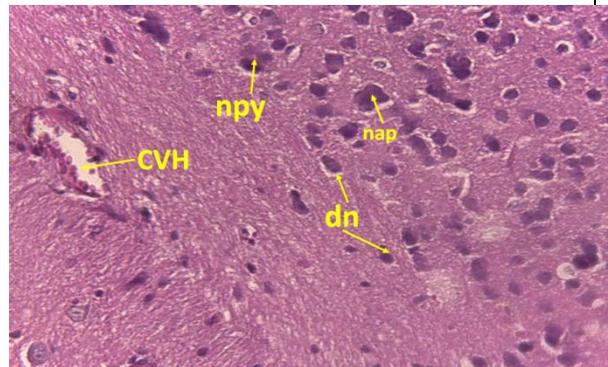
A1 (control-rat)



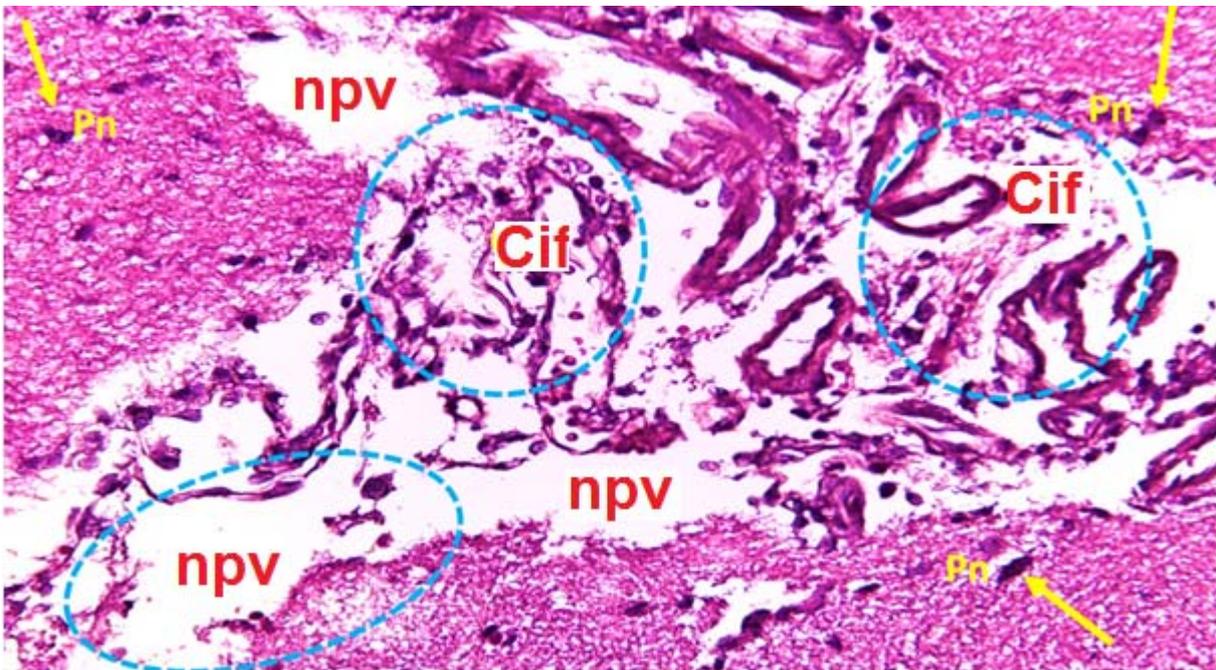
A2 (control-rat)



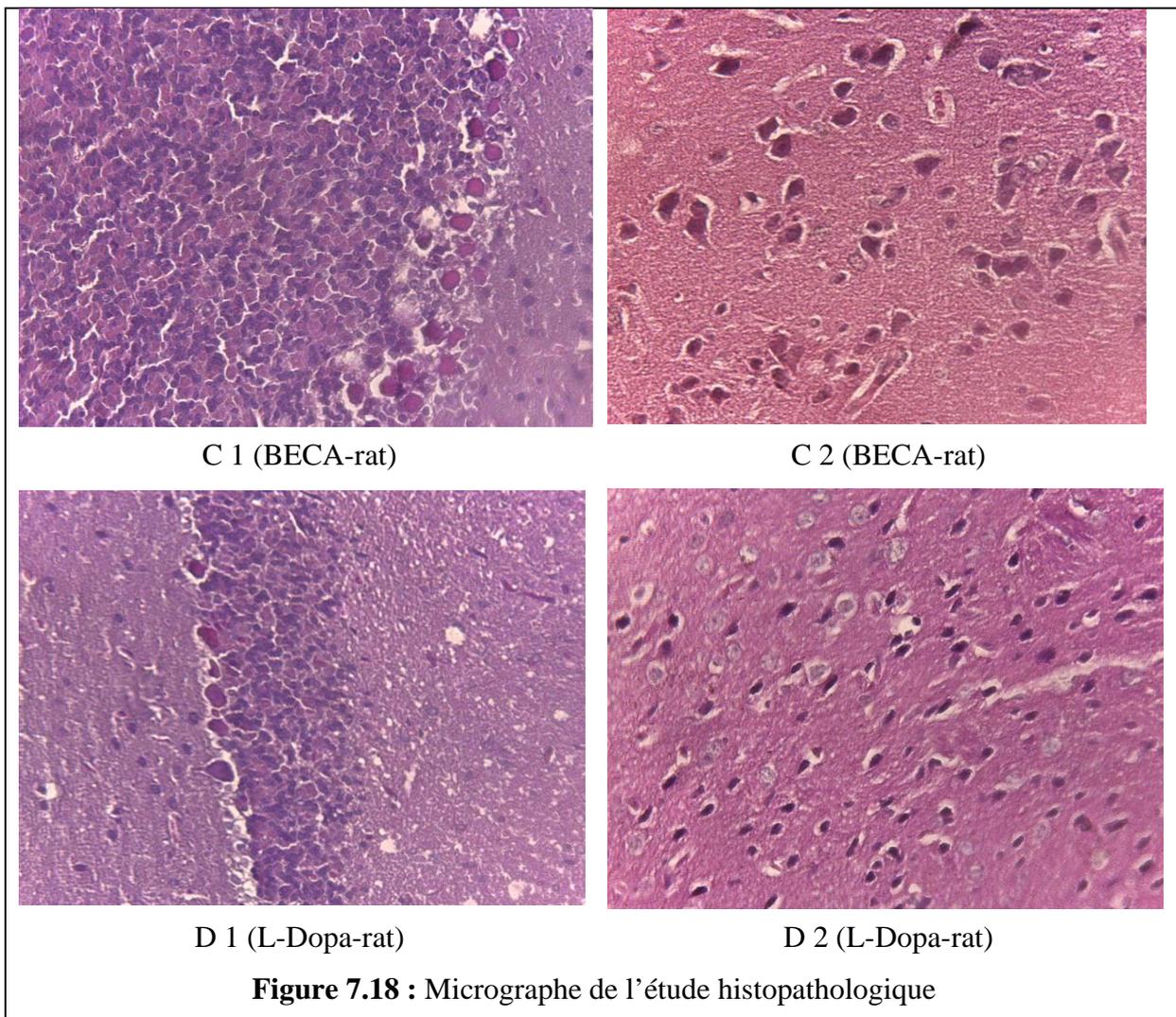
B1 (Roténone-rat)



B2 (Roténone-rat)



B3 (Roténone-rat)



A : (control-rat) : coupes histologiques du cortex cérébrale montrant une architecture histologique normale ; couche moléculaire (ML ; population de neurones), cellule pyramidale (pyr), cellule de neuroglie (ng), capillaire (cp), neuropil (pn) ; (H&E. 400 x).

B : B1, B2, B3 (Roténone-rat) : modifications histologiques multifocales de la ML du cortex cérébral. La structure du cortex est désorganisée (Fig.7.18 B1, B2, B3) ; Vacuolisation neuropile (npv), dégénérescence neuronale [(dn; B1, B2) ; flèche], cellules pyramidales endommagées irrégulières et rétrécissement cytoplasmique (npy), noyaux pycnotiques colorés foncés (pyd; fig.7.18, B3), cellules pyramidales hétérochromatiques et vacuolées (pyv ; Fig.7.18, B3), infiltration cellulaire (Cif; Fig.7.18, B3), congestion vasculaire et hémorragie (CVH; pointes de flèches; Fig.7.18, B2), (H&E.100 x).

C : (ROT+l'extrait *n*-BuOH de *C.africana* (BECA)-rat): diminution de l'incidence des lésions neuropathologiques ; moins de vacuolations, moins de neurones endommagés et des cellules pyramidales presque normales (Fig.7.18, C), (H&E. 100 x).

D : Fig 7.18, D 2 (ROT+L-Dopa-rat) : aspect histologique presque normal, architecture cérébrale préservée et cellules pyramidales régulières.

Chapitre 8 : Discussion

Screening phytochimique

Les études phytochimiques menées sur plusieurs espèces du genre *Centaurea* ont mis en évidence la présence des principales classes des métabolites secondaires tels que les polyphénols et les flavonoïdes. La majorité de ces métabolites sont connus par leurs activités biologiques démontrées à travers plusieurs études [1, 2, 3].

Les résultats obtenus montrent que les extraits *n*-BuOH et EtOAc de *C. africana* renferment des flavonoïdes et des composés phénoliques. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Öztürk et al. [4] qui ont montré que les taux les plus élevés des polyphénols et des flavonoïdes ont été trouvés dans les extraits d'acétate d'éthyle de plusieurs espèces végétales. Il a été rapporté que la teneur en polyphénols et en flavonoïdes pourrait dépendre de la polarité du solvant utilisé dans l'extraction [5].

Les composés phénoliques des plantes ont de multiples effets biologiques, notamment l'activité antioxydante. La puissante activité antioxydante des polyphénols et des flavonoïdes consiste dans leur capacité d'agir en tant qu'agent réducteur et donneur d'hydrogène [6, 7]. Dans notre étude, les taux obtenus de composés phénoliques et de flavonoïdes peuvent nous permettre de suggérer que les extraits de cette plante possèdent une activité antioxydante.

Évaluation de l'activité antioxydante des extraits (EtOAc et *n*-BuOH)

L'étude de l'activité antioxydante de la plante *C. africana* a été basée sur la capacité des extraits à éliminer les ERO et les ions métalliques. Cette capacité a été vérifiée en utilisant plusieurs tests *in vitro*. La méthode DPPH[°] est le dosage antioxydant le plus couramment utilisé pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de plante. À température ambiante, le radical DPPH[°] présente une intense coloration violette qui disparaît au contact d'une substance capable de saturer sa couche électronique. Ainsi, toute substance capable de faire disparaître (ou d'induire un changement de couleur vers le jaune) du DPPH[°] est considérée comme un piègeur de ce radical et par conséquent comme antioxydante [8]. La phase AcOEt a dévoilé l'effet scavenger le plus remarquable vis-à-vis le DPPH[°]. L'activité de piégeage de ces extraits peut être due à la forte présence des groupes hydroxyles, qui sont proportionnelle à la teneur des extraits en phénols [9]. L'activité antioxydante attribuée aux polyphénols s'explique en partie par leur capacité à capturer des RL et à piéger des métaux [10, 11], par conséquent, le pouvoir réducteur d'un composant peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle [12, 13]. Dans le test du pouvoir réducteur de fer, l'activité antioxydante des deux extraits de *C. africana* a été évaluée par spectrophotométrie en suivant l'augmentation d'absorbance accompagnée d'une conversion de la

couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) à la couleur bleue verte du fer ferreux (Fe^{2+}). Cette élévation d'absorbance reflète la présence des composés dotés d'une propriété antioxydante, agissant comme donneurs d'électrons qui réduisent les ions ferriques (Fe^{3+}) en ions ferreux (Fe^{2+}) [10]. Notre étude montre que le pouvoir réducteur des extraits de *C. africana* est dépendant de leurs concentrations. L'effet chélateur de la fraction EtOAc est plus marquant comparativement à la fraction *n*-BuOH.

Les RL induisent la peroxydation lipidique des acides gras insaturés dans la bicouche lipidique de la membrane. Cette peroxydation peut être induite dans l'homogénat du foie par le Fe^{2+} /système d'ascorbate [14]. Les extraits de *C. africana* ont réduit le taux du MDA d'une manière dépendante de leurs concentrations. L'extrait EtOAc s'est révélé être un meilleur inhibiteur de la peroxydation lipidique que l'extrait *n*-BuOH. Cet effet est proportionnel à la nature qualitative et quantitative des deux fractions. Ceci indique aussi la richesse de *C. africana* en termes de composés antioxydants. D'après ces résultats, on peut dire qu'il existe une corrélation élevée et positive entre l'activité antioxydante des extraits et leurs teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes totaux.

Les deux extraits de *C. africana* diffèrent dans la réponse des tests anti-oxydants. L'effet bénéfique de l'extrait EtOAc peut être attribué à la présence de quantités élevées de polyphénols. Des études phytochimiques antérieures sur *C. africana* [15, 16] ont révélé la richesse de l'extrait EtOAc en antioxydants ; polyphénols tels que l'acide 5-hydroxyfêrulique, le 3,4-dihydroxybenzoate d'éthyle et dérivés polyhydroxy et polyméthoxy des flavonols et des flavones (hispiduline, nepetine, centaureidin, chrysoeriol, jaceidin, centaurein) [17, 18, 19, 20, 21, 22]. Nos résultats concordent avec plusieurs études selon lesquelles les espèces *Centaurea* pourraient être considérées comme sources potentiels d'agents antioxydants. Les extraits dichlorométhane et de méthanol des parties aériennes de *C. pamphylica* ont présenté une activité antioxydante considérable [23]. L'extrait hydro-alcoolique de *C. behen* possède une forte activité de piégeage des radicaux libres [24]. L'extrait méthanolique de *C. polyclada* possède une forte activité d'élimination des radicaux DPPH° [25]. *C. saligna*, *C. virgata* et *C. kurdica* ont été mentionnés comme agents antioxydants potentiels [26]. Il est intéressant de noter que les espèces de *Centaurea* en Algérie ont été signalées comme des agents antioxydant potentiel. Des études précédentes ont rapporté que les extraits butanoliques de fleurs de *C. maroccana* et *C. acaulis* sont efficaces contre la néphrotoxicité du tétrachlorure de carbone grâce à l'amélioration du système de défense antioxydant [27]. De plus, l'extrait butanolique de *C. choulettiana* a présenté une néphroprotection significative contre le stress oxydatif induit par le cisplatine chez les souris, et a présenté aussi une inhibition de la peroxydation lipidique *in vitro* [28, 29]. Les extraits d'acétate d'éthyle et de butanol de *C. sphaerocephala* présentaient une inhibition significative des radicaux DPPH° [30]. L'extrait acétate d'éthyle de *C.*

resupinata possède un potentiel antioxydant intéressant par rapport à l'extrait *n*-butanol de la même plante [31].

Références bibliographiques

- [1] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol.* 1999; 299:152-178.
- [2] Ahmed D, Khan MM, Saeed R. Comparative Analysis of Phenolics, Flavonoids, and Antioxidant and Antibacterial Potential of Methanolic, Hexanic and Aqueous Extracts from *Adiantumcaudatum* Leaves. *Antioxidant.* 2015; 4:394-409.
- [3] Ordonez AAL, Gomez JD, Vattuone MA, Isla MI. Antioxidant activities of *Sechiumedule* (*Jacq.*) Swart extracts. *Food Chem.* 2006; 97(3):452–458.
- [4] Öztürk N, Tunçel M, Potoğlu-Erkara I. Phenolic compounds and antioxidant activities of some *Hypericum* species: A comparative study with *H. perforatum*. *Pharm Biol.* 2009; 47(2): 120-127.
- [5] Aissaoui H, Menad A, Mezhoud S, Ameddah S, Mekkiou, R, Benayache S, benayache F. Phytochemical screening, quantitative analysis and antioxidant activity of *Lifago dielsii Schweunj & Mushl.* (Asteraceae). *Phytomedicine.* 2014; 6(2):280-285.
- [6] Benabdallah A, Rahmoune C, Boumendjel M, Aissi O, Messaoud C. Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha species* (Lamiaceae) from northeast of Algeria. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2016; 6(9):760-766.
- [7] Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *J. Funct. Foods.* 2015; 18:820-897.
- [8] Ohinishi M, Morishita H, Iwahashi H, Toda S, Shirataki Y, Kimura M, Kido R. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. *Phytochemistry.* 1994; 36(3):579-583.
- [9] Kerkatou M, Menad A, Sarri D, León F, Brouard I, Bouldjedj R, Chalard P, Ameddah S, Benayache S, Benayache F. Secondary metabolites from *Genista aspalathoides* Lamks sp. *aspalathoides* M. *Der Pharmacia Lettre.* 2013; 5(5):285-289.
- [10] Gordon MH. The mechanism of the antioxidant action *in vitro*. In: *Food antioxidants*, HudsonBJF(Ed):London, Elsevier. 1990; 1-18.
- [11] Dinis TC, Maderia VM, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 315:161-169.

- [12] Oracz J, Zyzelewicz D. In Vitro Antioxidant Activity and FTIR Characterization of High-Molecular Weight Melanoidin Fractions from Different Types of Cocoa Beans. *Antioxidants*. 2019; 8(11) E560.
- [13] Dar RA, Brahman PK, Khurana N, Wagay JA, Lone ZA, Ganaie MA, Pitre KS. Evaluation of antioxidant activity of crocin, podophyllotoxin and kaempferol by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Arab. J. Chem.* 2017; 10.
- [14] Akanni OO, Owumi SE, Adaramoye OA. *In vitro* studies to assess the antioxidative, radical scavenging and arginase inhibitory potentials of extracts from *Artocarpus altilis*, *Ficus exasperate* and *Kigelia africana*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2014; 4(Suppl. 1), S492-S499.
- [15] Seghiri R, Mekkiou R, Boumaza O, Benayache S, Bermejo J, Benayache F. phenolic compounds from *Centaurea africana*. *Chem. Nat. Compd.* 2006; 42:610-611.
- [16] Seghiri R, Boumaza O, Mekkiou R, Benayache S, Mosset P, Quintana J, Estevez F, Leon F, Bermejo J, Benayache F. A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochem. Lett.* 2009; 2(3):114-118.
- [17] Osman WJA, Mothana RA, Basudan O, Mohammed MS, Mohamed MS. Antibacterial effect and radical scavenging activity of Hispidulin and Nepetin: A two flavones from *Tarconanthus camphorates L.* *World J Pharm Res.* 2014; 4:424-433.
- [18] Pérez G RM, Vargas SR, Martinez MFJ, Cordova RI. Antioxidant and free radical scavenging activities of 5,7,3 -trihydroxy-3,6,4'-trimethoxyflavone from *Brickellia veronicaefolia*. *Phytother. Res.* 2004; 18(5):428-430.
- [19] Mishra B, Priyadarsini KI, Kumar MS, Un-nikrishnan MK, Mohan H. Effect of Oglycosilation on the antioxidant activity and free radical reactions of a plant flavonoid, chrysoeriol. *Bioorg. Med. Chem.* 2003; 11(13):2677-2685.
- [20] Aljancić I, Stanković M, Tesević V, Vujisić L, Vajs V, Milosavljević S. Protective effect on human lymphocytes of some flavonoids isolated from two *Achillea* species. *Nat. Prod. Commun.* 2010; 5(5):729-732.
- [21] Jachak SM, Gautam R, Selvam C, Madhan H, Srivastava A, Khan T. Anti-inflammatory, cyclooxygenase inhibitory and antioxidant activities of standardized extracts of *Tridax procumbens L.* *Fitoterapia.* 2011; 82(2):173-177.
- [22] Gaweesh A, Sengab AENB, El-Hefnawy HM, Osman SM, Abdou AM. Phytoconstituents, cytotoxic, antioxidant and hepatoprotective activities of the aerial parts of *Lycium shawii R.* Growing in Egypt. *Med. Aromat. Plants.* 2015; 4:180.
- [23] Shoeb M, Macmanus S, Kong-Thoo-Lin P, Celik S, Jaspars M, Nahar L, Sarker SD. Bioactivity of the extracts and isolation of lignans and a sesquiterpene from the aerial parts of *Centaurea pamphylica* (Asteraceae). *Daru.* 2007; 15(3):118-122.

- [24] Chougule P, Pawar R, Limaye D, Joshi YM, Kadam V. *In-vitro* Antioxidant activity of ethanolic extract of *Centaurea behen*. J. Appl. Pharm. Sci. 2012; 02(04):106-110.
- [25] Granger M, Samson E, Sauvage S, Majumdar A, Singh - Nee Nigam P, Nahar L, Celik Z, Sarker SD. Bioactivity of extracts of *Centaurea polyclada* (asteraceae). Arch. Biol. Sci., 2009; 61(3):447-452.
- [26] Keser S, Keser F, Turkoglu I, Kaygılı O, Tekin S, Demir E, Karatepe M, Yilmaz O, Kırbag S, Sandal S, Turkoglu S. *In Vitro* Biological evaluation and phytochemical contents of three *Centaurea* species growing from Eastern Anatolia in Turkey. KSU J. Agric Nat, 2020; 23:148-156.
- [27] Baali N, Baali S, Bentamen A, Ameddah S. Ameliorative effect of *Centaurea maroccana* and *Centaurea acaulis* against nephrotoxicity induced by carbon tetrachloride. Curr. Bioact. Compd. 2018; 14.
- [28] Bioud K, Azzouzi D, Benrebai M, Mekkiou R, Benayache S, Benayache F, Ameddah S. Renoprotective Effect of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) Leaves on Cisplatin-induced Oxidative Stress and Renal dysfunction in Mice. J. Appl. Pharm. Sci. 2017; 7(11):147-154.
- [29] Azzouzi D, Bioud K, Demirtas I, Gul F, Sarri D, Benayache S, Benayache F, Mekkiou R. Phenolic Profile and Antioxidant Activity of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) Extracts. Comb. Chem. High Throughput Screen. 2016; 19(10):841-846.
- [30] Lahneche AM, Boucheham R, Ozen T, Altun M, Boubekri N, Demirtas I, Bicha S, Bentamene A, Benayache F, Benayache S, Zama D. *In vitro* antioxidant, DNA-damaged protection and antiproliferative activities of ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *Centaurea sphaerocephala*L. An. Acad. Bras. Cienc. 2019; 91(3).
- [31] Bouzghaia B, Moussa MTB, Goudjil R, Harkat H, Pale P. Chemical composition, *in vitro* antioxidant and antibacterial activities of *Centaurea resupinata subsp. dufourii* (dostál) greuter. Nat. Prod. Res. 2020; 1-5, 1-6.

Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

L'inflammation est un élément essentiel de la réponse du système immunitaire. La fièvre, la rougeur, le gonflement et la douleur sont des symptômes classiques qui caractérisent l'inflammation aiguë [1]. Les composés phénoliques pourraient moduler les activités de certains enzymes et d'autres protéines fonctionnelles impliquées dans les processus inflammatoires [2]. L'activité anti-inflammatoire se traduit à travers plusieurs mécanismes agissant sur de nombreuses étapes des processus physiopathologiques [3, 4]. La production de l'oxyde nitrique (NO) est liée à la pathogenèse de plusieurs maladies telles que l'inflammation et la carcinogenèse [5]. La toxicité du NO est fortement accrue par sa réaction avec le superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en formant du peroxynitrite

(ONOO⁻) [6]. Nos résultats ont clairement montré que la fraction *n*-BuOH était plus efficace en termes d'activité de piégeage de ce radical. Cela peut être dû aux molécules contenues dans l'extrait qui entrent en compétition avec l'oxygène pour réagir avec l'oxyde nitrique, inhibant ainsi la formation de peroxy-nitrite [7]. Les inhibiteurs de NO ont des effets bénéfiques sur certains aspects de l'inflammation et des lésions tissulaires observées dans les maladies inflammatoires [8].

L'œdème de la patte induit par la carragénine chez les rats est un modèle standard et pratique de l'inflammation aiguë qui est largement utilisé pour l'évaluation des propriétés anti-inflammatoires de différents agents [9]. La différence de l'épaisseur de la patte des rats avant et après l'injection de la carragénine a été exploitée dans la présente étude pour évaluer l'effet anti œdémateux de l'extrait *n*-BuOH. Le développement de l'œdème induit par la carragénine est bi-phasique [10, 11]. La première phase se produit entre 0 et 3 h après l'injection de l'agent phlogistique, et est attribuée à la libération d'histamine, de sérotonine et de bradykinine sur la perméabilité vasculaire. A ce stade, le volume de l'œdème atteint son maximum puis commence à se diminuer. La deuxième phase (3 à 6 h) est liée à la libération de prostaglandines et des ERO [10, 11]. L'extrait *n*-BuOH a inhibé significativement l'œdème. L'inhibition la plus élevée a été enregistrée au bout de 6 heures. Cet effet est comparable à celui obtenu par le diclofénac de sodium, qui a aussi inhibé la phase liée à la libération de prostaglandines (2^{ème} phase). Ces résultats sont alignés aux études précédentes rapportant que l'effet anti-inflammatoire des polyphénols peut être expliqué par l'inhibition des cycloxygénases (COX) et donc de la synthèse des prostaglandines [12, 2]. L'effet de cet extrait peut donc être dû à son efficacité à inhiber les médiateurs responsables de l'inflammation.

Les réponses inflammatoires sont caractérisées par une accumulation de neutrophiles, de monocytes et de macrophages. La MPO est une enzyme présente dans les neutrophiles. Le MDA est un produit de la peroxydation lipidique qui est employé comme indice de lésions induites par les ERO [13, 14, 15]. Il a été rapporté que les composés polyphénoliques sont capables d'inhiber les oxydants résultants des inflammations liées à un excès de RL et d'inhiber le recrutement des neutrophiles [13, 16]. Nos résultats ont montré une augmentation significative des niveaux du MDA et de la MPO dans le groupe carragénine par rapport au groupe témoin. Le prétraitement des rats par l'extrait *n*-BuOH confirme que cet extrait a un effet anti-inflammatoire significatif en conservant les taux de la MPO et du MDA. L'inhibition de l'activité de la MPO témoigne sa capacité à réduire la libération de médiateurs de la phase aiguë de l'inflammation [14], et l'inhibition du MDA confirme qu'il est capable d'inhiber les oxydants issus de l'inflammation [16]. L'effet anti-inflammatoire de la fraction *n*-BuOH pourrait s'expliquer par sa richesse en flavonoïdes et en polyphénols. Ceci peut être confirmé par son profil chimique qui a été obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS/MS), et pour lequel la majorité des constituants polyphénoliques ont été précédemment rapportés comme

anti-inflammatoires, tels que l'acide caféique [17], l'acide chlorogénique [18], le kaempférol [19], l'acide cichoric [20], l'acide Hydroxybenzoic [21], l'hésperidine [22], l'acide protocatéchique [23], le 4-hydroxybenzaldéhyde [24], l'acide rosmarinique [25]. Les résultats des études précédentes ont révélé que l'application topique d'un extrait méthanolique de *C. africana* favorisait la cicatrisation des plaies, et augmentait la résistance des tissus à la rupture et la teneur en hydroxyproline. De plus, l'utilisation de cette plante dans le modèle d'inflammation aiguë (œdème auriculaire induit par l'huile de croton) a montré une bonne activité anti-inflammatoire [26]. De manière générale, les membres du genre *Centaurea* ont fait l'objet de recherches de plusieurs études anti-inflammatoires. À titre d'exemple, l'étude menée par Koca et ses collaborateurs a montré que l'extrait méthanolique de *C. iberica* à une dose de 200 mg/kg a prouvé son effet anti-inflammatoire [27]. Talhouk et ses collaborateurs ont également signalé que l'extrait aqueux de *C. ainetensis* a inversé l'œdème de la patte chez le rat [28]. L'extrait de chloroforme de *C. athoa* présentait une activité anti-inflammatoire sur le test d'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat [29]. L'extrait éthanolique de la fleur de *C. tchihatcheffii* à une dose de 200 mg/kg a supprimé l'œdème et la prostaglandine-E2 (PGE2) dans le tissu de la patte [30]. Les deux lactones sesquiterpéniques de type guaianolide présentés dans l'extrait chloroforme des parties aériennes de *C. solstitialis* ont démontré des propriétés anti-inflammatoires [31].

Références bibliographiques

- [1] Van J, Botting R. Inflammation and the mechanism of action of antiinflammatory drugs. *FASEB J.* 1987; 1(2): 89-96.
- [2] Mitjavila MT, Moreno JJ. The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases. *Biochem. Pharmacol.* 2012; 84(9):1113-1122.
- [3] Martinez J, Sanchez T, Moreno JJ. Regulation of prostaglandin E2 production by the superoxide radical and nitric oxide in mouse peritoneal macrophages. *Free Radic. Res.* 2000; 32:303–311.
- [4] Hanfer M, Cheriet T, Ameddah S, Mancini I, Seghiri R, Menad A, Benayache S, Benayache F. Iridoids and anti-inflammatory properties of *n*-butanol extract of *Linaria tingitana* Boiss. & Reut. *Nat Prod Res.* 2017.
- [5] Lee J-HI, Kim J-S, S Shin D. Antioxidant, antiinflammatory, and anticarcinogenic Activities of araloside A Form *Aralia elata*. *J App Pharm Sci.* 2018; 8(10): 129-135. DOI: 10.7324/JAPS.2018.81017
- [6] Salvemini D, Ischiropoulos H, Cuzzocrea S. Roles of nitric oxide and superoxide in inflammation. *Methods In Mol Biol.* 2003; 225: 291-203.

- [7] Menaga D, Rajakumar S, Ayyasamy P. Free Radical Scavenging Activity of Methanolic Extract of *Pleurotus Florida* Mushroom. *Int J Pharm Sci.* 2013; 5: 601-606.
- [8] Hazeena Begum V, Muthukumaran P. Phytochemical and free radical scavenging activity of Poorna chandrodayam chendooram (metallic herbal based drug). *JPHYTO.* 2014; 3(6): 418-422.
- [9] Singh RP, Sharad S, Kapur S. Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: Relevance of Dietary Antioxidants. *JACM.* 2004; 5:218–225
- [10] Baharuddin AA, Roosli RAJ, Zakaria ZA, Md Tohid SF. *Dicranopteris linearis* extract inhibits the proliferation of human breast cancer cell line (MDAMB- 231) via induction of S-phase arrest and apoptosis. *Pharm. Biol.* 2018; 56(1):422-432.
- [11] Soni RK, Irchhaiya R, Dixit V, Bhat ZA, Wani HA, Najjar AH. Antiinflammatory activity of *Kirganelia reticulata* (poir). Baill. Root by carrageenan induced rat paw oedema model. *Int. J. Pharma Sci.* 2014; 6(1):520-523.
- [12] Vivancos M, Moreno JJ. Effect of resveratrol, tyrosol and β -sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW 264.7 macrophages. *Br. J. Nutr.* 2008; 99(6):1199-1207.
- [13] Attiq A, Jalil J, Husain K, Ahmad W. Raging the war against inflammation with natural products. *Front. Pharmacol.* 2018; 9:976.
- [14] Lloret S, Moreno JJ. Effects of an anti-inflammatory peptide (antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. *Biochem. Pharmacol.* 1995; 50(3):347-353.
- [15] Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ. Res.* 2018; 122(6):877-902.
- [16] Sdayria J, Rjeibi I, Feriani A, Ncib S, Bouguerra W, Hfaiedh N, Elfeki A, Allagui MS. Chemical Composition and Antioxidant, Analgesic, and Anti-Inflammatory Effects of Methanolic Extract of *Euphorbia retusa* in Mice. *Pain Res. Manag.* 2018; 20184838413.
- [17] Da Cunha FM, Duma D, Assreuy J, Buzzi FC, Niero R, Campos MM, Calixto JM. Caffeic acid derivatives: *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory properties. *Free Radical Research.* 2004; 38(11): 241-253.
- [18] Liang N, Kitts DD. Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions. *Nutrients.* 2015; 8:16.
- [19] Wang J, Fang X, Ge L, Cao F, Zhao L, Wang Z, Xiao W. Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol. *PLoS ONE.* 2018; 13(5): e0197563

- [20] Jiang L, Li W, Wang Y, Zhang X, Yu D, Yin Y, Xie Z, Yuan Y. Effects of cichoric acid extract from *Echinacea purpurea* on collagen-induced arthritis in rats. *Am. J. Chin. Med.* 2014; 42:679–692.
- [21] Manuja R, Sachdeva S, Jain A, Chaudhary J. A comprehensive review on biological activities of p-hydroxy benzoic acid and its derivatives. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2013; 22:109–115.
- [22] Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytother Res.* 2015; 29:323-31.
- [23] Son JH, Kim S, Jang HH, Lee SN. Protective effect of protocatechuic acid against inflammatory stress induced in human dermal fibroblasts. *biomed Dermatol.* 2018; 2(9).
- [24] Lim EJ, Kang HJ, Jung HJ, Park EH. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and antinociceptive activities of 4-hydroxybenzaldehyde. *Biomol Ther.* 2008; 16(3):231–236.
- [25] Rocha J, Eduardo-Figueira M, Barateiro A, Fernandes A, Brites D, Bronze R, Duarte CM, Serra AT, Pinto R, Freitas M, Fernandes E, Silva-Lima B, Mota-Filipe H, Sepodes B. Anti-inflammatory effect of rosmarinic and an Extract of *Rosmarinus officinalis* in Rat Models of Local and Systemic Inflammation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2015;116:398-413.
- [26] Zaouani M, Bitam A, Baz A, Benali Y, Mahdi MH. In vivo evaluation of wound healing and anti-inflammatory activity of methanolic extract of roots of *Centaurea africana* (L.) in a topical formulation. *Asian J Pharm Clin Res.* 2017; (10):341-346.
- [27] Koca U, Suntar IP, Keles H, Yesilada E, Akkol EK. In vivo anti-inflammatory and wound healing activities of *Centaurea iberica* Trev. ex Spreng. *J. Ethnopharmacol.* 2009; 126(3):551-556.
- [28] Talhouk RS, El-Jouni W, Baalbaki R, Gali-Muhtasib H, Kogan J, Talhouk SN. Antiinflammatory bio-activities in a water extract of *Centaurea ainetensis*. *J. Med. Plants Res.* 2008; 2(2), 24-33.
- [29] Erel SB, Demir S, Nalbantsoy A, Ballar P, Khan S, Yavasoglu NUK, Karaalp C. Bioactivity screening of five *Centaurea* species and *in vivo* anti-inflammatory activity of *C. athoa*. *Pharm. Biol.* 2014; 52(6):775-781.
- [30] Koca U, Toker G, Kupeli-Akkol E. Assessment of the extracts of *Centaurea tchihatcheffii* Fischer for anti-inflammatory and analgesic activities in animal models. *Trop. J. Pharm. Res.* 2009; 8(3):193-200.
- [31] Gurbuz I, Yesilada E. Evaluation of the antiulcerogenic effect of sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* by using various *in vivo* and biochemical techniques. *J. Ethnopharmacol.* 2007; 112(2):284-291.

Évaluation des tests du comportement

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative motrice liée à l'âge [1]. Une anomalie neurochimique constante de la MP est la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la SNpc, conduisant à une réduction des niveaux de la DA striatale [2]. L'hypothèse actuelle suggère que le stress oxydatif et la neuroinflammation jouent un rôle crucial dans le développement de la MP [3]. La roténone est un pesticide qui peut être utilisé pour générer un modèle animal expérimental de MP [4, 5]. Le but de notre étude était d'évaluer la capacité neuroprotectrice potentielle de l'extrait *n*-BuOH dans un modèle de rat. Nous avons déclenché un phénotype de MP chez le rat par un traitement prolongé par la roténone à faible dose. Tout d'abord, nous avons examiné si l'administration de l'extrait *n*-BuOH à des rats traités par la roténone avait fourni des effets bénéfiques sur le comportement, puis nous avons évalué l'influence du traitement sur les marqueurs neurochimiques, antioxydants, inflammatoires et apoptotiques.

La majorité des études portant sur la ROT ont mis l'accent sur la capacité de cette toxine à induire des effets neuropathologiques chez les rongeurs rappelant ceux observés dans la maladie de Parkinson et à provoquer des symptômes tels que le dysfonctionnement moteur chez les rongeurs [6, 7, 8, 9]. Les résultats de notre étude comportementale du groupe traité par la ROT sont en accord avec ceux d'autres études, qui ont démontré que la ROT a considérablement altéré le comportement, se manifestant par une augmentation progressive de la catalepsie, et une diminution de l'activité locomotrice. Le test de catalepsie a été principalement utilisé pour qualifier les symptômes parkinsoniens spécifiques chez le rat, qui sont la rigidité et la bradykinésie [7, 8]. Des études ont montré que divers dysfonctionnements moteurs commencent à s'installer dans la 1^{ère} semaine du traitement par la ROT [9]. L'augmentation de latence de descente (test de catalepsie) dans le groupe ROT a été inversée après l'administration de la L-Dopa [10]. En plus, les scores comportementaux des rats traités par la ROT, obtenus à l'aide d'une échelle d'analyse des mouvements de Ludolph, indiquaient une augmentation en fonction du temps par rapport aux rats témoins. Dans notre étude, tous les animaux traités par la ROT ont montré une augmentation de l'immobilisation. Cette diminution de l'activité locomotrice a été améliorée par le traitement par la L-Dopa [11]. Cela est peut-être dû à une augmentation de la synthèse de la DA qui a été induite par son précurseur, la L-Dopa [11, 12].

La L-Dopa est le traitement médicamenteux le plus utilisé pour la MP, mais qui possède en même temps plusieurs effets secondaires lorsqu'il est utilisé à long terme [12]. Par conséquent, il existe un besoin de nouveaux agents, pharmacologiquement actifs, qui présentent une meilleure tolérance par les PcP. Actuellement, divers produits naturels et phytochimiques sont largement explorés pour la gestion de plusieurs maladies neurodégénératives, y compris la MP [11, 13, 14, 15]. L'extrait *n*-BuOH de *C. africana* a montré une augmentation de la locomotion par rapport au groupe ROT :

cela peut être dû aux propriétés protectrices de cet extrait contre les dommages induits par la ROT dans les cellules de la substance noire.

En plus des déficits de comportement, des études antérieures ont signalé que les rats du groupe traité à la roténone consommaient moins de nourriture et d'eau que les rats du groupe témoin [16]. Dans la présente étude, une diminution significative du poids corporel a été observée chez le rat après l'administration de ROT. Des études suggèrent que cette réduction pourrait être liée aux troubles gastriques [17].

L'exposition à la roténone est associée à la mortalité chez certains animaux. La mortalité est rencontrée pendant le traitement par la ROT à cause de sa haute toxicité pour divers organes, notamment le cœur, le foie, les reins et le tractus gastro-intestinal [18, 19]. Des études suggèrent que la mortalité des rats directement après l'injection de la ROT est attribuée principalement à la toxicité aiguë plutôt que l'effet cumulatif neurotoxique [19].

Évaluation des tests neurochimiques

Il est bien documenté que chez les patients atteints de MP, les niveaux de dopamine de la SN et du ST sont diminués. D'un autre côté, l'administration de ROT a épuisé le niveau de la DA cérébrale [20, 21]. D'après nos résultats, il est clair que la ROT a induit une réduction marquée de la DA par rapport à celle du groupe témoin. Il a été supposé que la diminution des niveaux de la DA du SN et du ST pourrait être l'un des multiples mécanismes contribuant à la pathogenèse de la MP, en déclenchant la mort cellulaire dans la SN [20]. Bien que, les mécanismes par lesquels la dégénérescence des neurones dans la MP sont mal connus, il y a des suggestions d'implication des mécanismes glutamatergiques dans la pathogenèse de cette maladie [22]. Il est prouvé que la diminution d'innervation dopaminergique du ST dans la MP est associée à une suractivité du glutamate qui provoque l'excitotoxicité et la production de RL [23]. La stratégie thérapeutique la plus courante pour la MP est de restaurer les niveaux de DA par l'administration de la L-Dopa qui est capable de franchir la BHE [12]. Comparé au groupe ROT, le co-traitement de ROT avec l'extrait *n*-BuOH de *C. africana* a entraîné une augmentation significative du niveau de la DA et une diminution du glutamate. Les résultats obtenus corroborent les résultats antérieurs [24].

Évaluation de l'activité antioxydante *in vivo*

Des données de recherche antérieures supposent que les dommages oxydatifs peuvent jouer un rôle principal dans la neurodégénération induite par la ROT et révèlent que les dommages oxydatifs sont produits avant le développement des lésions dopaminergiques nigrostriatales [25]. Le cerveau est plus vulnérable au stress oxydatif que les autres tissus, en raison de sa forte activité métabolique, de la demande élevée en oxygène, de l'auto-oxydation de la DA, de ses composants lipidiques élevés et

de ses grands niveaux de fer [26]. La paraoxonase 1 (PON1) est une enzyme de haute densité, qui est associée aux lipoprotéines et qui fonctionne comme un antioxydant et également comme un détoxifiant des xénobiotiques. Une activité altérée de la PON1 a été observée dans les maladies neurodégénératives [27]. Dans notre étude, et en concordance avec des études précédentes, l'administration de ROT a provoqué une inhibition de l'activité cérébrale de la PON1 qui a été associée à une augmentation de la peroxydation lipidique [28]. Le traitement par l'extrait *n*-BuOH a été associé à une restauration de l'activité de la PON1 et à la suppression des niveaux excessifs de LPO ; effets susceptibles d'être une conséquence de l'action neuroprotective de l'extrait chez le rat parkinsonien. Des études publiées précédemment ont révélé que la réduction des niveaux de glutathion (GSH) (environ 40 % dans la MP humaine) est le plus ancien événement biochimique rapporté, se produisant dans la SNpc des PcP [29]. Une autre étude indique que la ROT affecte la concentration de GSH pendant 9 jours de traitement et cause un stress oxydatif dans le cerveau de rat [30]. Parmi les différents mécanismes impliqués dans la diminution du GSH et des enzymes métabolisant le glutathion, nous pouvons considérer la liaison de produits d'oxydation de la DA à des groupes non protéiques sulfhydryles entraînant une perte rapide du glutathion intracellulaire [31]. Une autre explication possible de la perte de GSH striatale est que les concentrations extracellulaires élevées de glutamate bloquent l'absorption de cystéine (un acide aminé essentiel à la synthèse soutenue du glutathion dans les astrocytes) [32]. Conformément à ces rapports, nos résultats montrent également que l'administration de la ROT a provoqué une déplétion en GSH, qui a été accompagnée d'une diminution de l'activité des enzymes métabolisant le glutathion (GPx, GR et GST) dans les compartiments cytosoliques du cerveau. Le co-traitement avec l'extrait *n*-BuOH semble être en mesure d'équilibrer l'activité antioxydante endogène en améliorant les niveaux de GSH et en restituant l'activité des GPx, GR et GST. Ces résultats concordent avec les études précédentes [33].

Lors de l'évaluation du stress oxydatif mitochondrial qui a été effectuée sur des mitochondries du cerveau des rats traités par la ROT, une altération des mitochondries a été enregistrée à travers un taux élevé du MDA et une diminution marquée des enzymes antioxydantes. A l'échelle mitochondriale, le superoxyde dismutase de manganèse (Mn-SOD) est le principal enzyme responsable de la conversion d' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 . Le Mn-SOD est un composant principal du système de défense cellulaire contre la toxicité oxydative, car l' $O_2^{\cdot-}$ peut réagir avec le H_2O_2 pour générer le radical OH, qui est plus toxique que l' $O_2^{\cdot-}$ et que H_2O_2 [34]. Les résultats d'une étude précédente ont confirmé que les ERO mitochondriales jouent un rôle clé dans l'apoptose induite par la ROT. Dans une étude préalable, la surexpression de Mn-SOD dans un modèle des cellules *in vitro* a inhibé l'augmentation des ERO, la libération du Cyt C, l'activation de caspase-3 et la rupture de l'ADN induites par la ROT [35]. Nos résultats ont révélé que l'extrait *n*-BuOH administré oralement

(200 mg/kg) aux rats co-traités avec la ROT protège les mitochondries en préservant le taux du GSH et l'activité des Mn-SOD et GPx mitochondriales. Dans ce sens, des études ont également démontré que des extraits végétaux, tel que l'extrait aqueux de graines de tomate, ont atténué de manière significative la dysfonction oxydative mitochondriale induite par la ROT [36, 37].

Plusieurs études suggèrent que les flavonoïdes peuvent stimuler la transcription des antioxydants [38]. L'effet neuroprotecteur de l'extrait *n*-BuOH pourrait être dû à sa richesse en polyphénols identifiés par l'analyse LC/MS/MS. Les antioxydants les plus abondants et les plus puissants sont l'acide chlorogénique [39], l'acide *p*-hydroxybenzoïque [40], les deux dérivés d'apigénine purifiés [41], l'acide caféïque [42], l'acide gentisique [43], le kaempferol [44], l'acide cichorique [45], la rutine [46], l'héspéridine [47], l'acide protocatéchique [48, 49], le 4-hydroxybenzaldéhyde [50] et l'acide rosmarinique [51]. Les interactions synergiques possibles de ces composés phénoliques ont montré des propriétés antioxydantes qui peuvent être bénéfiques pour la MP [13].

Références bibliographiques

- [1] Cerri S, Mus L, Blandini F. Parkinson's disease in women and men: What's the difference?. *J Parkinsons Dis.* 2019; 9(3):501-515.
- [2] Pang SY, Ho PW, Liu H, Leung CT, Li L, Chang EES, Ramsden DB, Ho SL. The interplay of aging, genetics and environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Transl Neurodegener.* 2019; 8(23).
- [3] Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2000; 3(12):1301–1306.
- [4] Heinz S, Freyberger A, Lawrenz B, Schladt L, Schmuck G, Ellinger-Ziegelbauer H. Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation. *Sci Rep.* 2017; 7:45465.
- [5] Xue X, Bian JS. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide in Parkinson's disease animal models: methods and protocols. *Methods in Enzymology.* 2015; 554: 169–186.
- [6] Cannon CH, Morley RJ, Bush ABG. The current refugial rainforests of Sundaland are unrepresentative of their biogeographic past and highly vulnerable to disturbance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009; 106, 11188–11193.
- [7] Huang J, Liu H, Gu W, Yan Z, Xu Z, Yang Y, Zhu X, Li Y. A delivery strategy for rotenone microspheres in an animal model of Parkinson's disease. *Biomaterials.* 2006; 27(6):937-946.
- [8] Bashkatova V, Alam M, Vanin A, Schmidt WJ. Chronic administration of rotenone increases levels of nitric oxide and lipid peroxidation products in rat brain. *Exp Neurol.* 2004; 186(2):235-241.

- [9] Thakur P, Nehru B. Anti-inflammatory properties rather than anti-oxidant capability is the major mechanism of neuroprotection by sodium salicylate in a chronic rotenone model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2013; 231:420-431.
- [10] Alam M, Schmidt WJ. L-DOPA reverses the hypokinetic behaviour and rigidity in rotenone-treated rats. *Behav Brain Res*. 2004; 153(2):439-446.
- [11] Siriwatananukul P, Rodsiri R, Ruangrunsi N. Effects of *Mucuna Macrocarpa* Seed Extract on Rotenone-Induced Parkinsonism Rats. *J Health Res*. 2012; 26(1), 21-24.
- [12] Hornykiewicz O. L-DOPA: From a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent. *Amino Acids*. 2002; 23(1-3):65–70.
- [13] Rabiei Z, Solati K, Amini-Khoei H. 2019. Phytotherapy in treatment of Parkinson's disease: a review. *Pharm Biol*. 57(1):355–362.
- [14] Khatri DK, Juvekar AR. Neuroprotective effect of curcumin as evinced by abrogation of rotenone-induced motor deficits, oxidative and mitochondrial dysfunctions in mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacol Biochem Behav*. 2016; 150-151:39-47.
- [15] Kartika B, Muralidharan P, Rahman H. Herbal treatment of Parkinsons: A review. *IISPRR*. 2010; 5(3):article-034.
- [16] Xiong ZK, Lang J, Xu G, Li HY, Zhang Y, Wang L, Su Y, Sun AJ. Excessive levels of nitric oxide in rat model of Parkinson's disease induced by rotenone. *Exp Ther Med*. 2015; 9(2):553-558.
- [17] Sharma N, Jamwal S, Kumar P. Beneficial effect of antidepressants against rotenone induced Parkinsonism like symptoms in rats. *Pathophysiology*. 2016; 23(2):123-134.
- [18] Sarkar S, Gough B, Raymick J, Beaudoin MA, Ali SF, Virmani A, Binienda ZK. Histopathological and electrophysiological indices of rotenone-evoked dopaminergic toxicity: Neuroprotective effects of acetyl-l-carnitine. *Neurosci. Lett*. 2015; 606:53–59.
- [19] Zaitone SA, Abo-Elmatty DM, Shaalan AA. Acetyl-l-carnitine and α -lipoic acid affect rotenone-induced damage in nigral dopaminergic neurons of rat brain, implication for Parkinson's disease therapy. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2012; 100(3), 347–360.
- [20] Wang T, Li C, Han B, Wang Z, Meng X, Zhang L, He J, Fu F. Neuroprotective effects of Danshensu on rotenone-induced Parkinson's disease models *in vitro* and *in vivo*. *BMC Complement Med Ther*. 2020; 20.
- [21] Tseng HC, Wang MH, Chang KC, Soung HS, Fang CH, Lin YW, Li KY, Yang CC, Tsai CC. Protective Effect of (-) Epigallocatechin-3-gallate on Rotenone-Induced Parkinsonism-like Symptoms in Rats. *Neurotox Res*. 2020; 37(3):669-682.
- [22] Caravaggio F, Nakajima S, Plitman E, Gerretsen P, Chung JK, Iwata Y, Graff-Guerrero A. The effect of striatal dopamine depletion on striatal and cortical glutamate: A minireview. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016; 65:49–53.

- [23] Jenner Peter, Carla Caccia. The role of glutamate in the healthy brain and in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Eur Neurol Rev.* 2019; 14(2):2–12.
- [24] Khadrawy YA, Salem AM, El-Shamy KA, Ahmed EK, Fadl NN, Hosny EN. Neuroprotective and therapeutic effect of caffeine on the rat model of Parkinson's disease induced by rotenone. *J Diet Suppl.* 2017; 14(5):553–572.
- [25] Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Greenamyre JT. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2003; 23(34):10756–10764.
- [26] Wang X, Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci.* 2010; (2):12.
- [27] Menini T, Gugliucci A. Paraoxonase 1 in neurological disorders. *Redox Rep.* 2013; 19: 49-58.
- [28] Khalil WKB, Assaf N, ElShebiney SA, Salem NA. Neuroprotective effects of bee venom acupuncture therapy against rotenone-induced oxidative stress and apoptosis. *Neurochem Int.* 2015; 80:79–86.
- [29] Barker JE, Heales SJR, Cassidy A, Bolaños JP, Land JM, Clark JB. Depletion of brain glutathione results in a decrease of glutathione reductase activity; an enzyme susceptible to oxidative damage. *Brain Res.* 1996; 716:118–122.
- [30] Yulianti AB, Sumarsono SH, Ridwan A, Yusuf AT. Increase of oxidative stress and accumulation of α -synuclein in *Wistar* rat's midbrain treated with rotenone. *ITB J. Sci.* 2012; 44 (4):317-332.
- [31] Maker HS, Weiss C, Silides DJ, Cohen G. Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *J Neurochem.* 1981; 36(2):589–593.
- [32] Schubert D, Piasecki D. Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade. *J Neurosci.* 2001; 21(19):7455–7462.
- [33] Ogunraku OO, Ogunyemi BO, Obboh G, Babatunde OO, Boligon AA. Modulation of dopamine metabolizing enzymes and antioxidant status by *Capsicum annuum* Lin in rotenone intoxicated rat brain. *Toxicol Rep.* 2019; 6:795–802.
- [34] Genova ML, Pich MM, Bernacchia A, Bianchi C, Biondi A, Bovina C, Falasca AI, Formiggini G, Castelli GP, Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1011:86-100.
- [35] Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem.* 2003; 278(10):8516-8525.

- [36] Gokul K, Muralidhara. Oral supplements of aqueous extract of tomato seeds alleviate motor abnormality, oxidative impairments and neurotoxicity induced by rotenone in mice: relevance to Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 2014; 39(7):1382-1394.
- [37] Javed H, Azimullah S, Abul Khair SB, et al. Neuroprotective effect of nerolidol against neuroinflammation and oxidative stress induced by rotenone. *BMC Neurosci.* 2016; 17(1):58.
- [38] Myhrstad MC, Carlsen H, Nordström O, Blomhoff R, Moskaug JØ. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma glutamyl cysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32(5):386–393.
- [39] Liang N, Kitts DD. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients.* 2015; 8(1):16.
- [40] Velika B, Kron I. Antioxidant properties of benzoic acid derivatives against superoxide radical. *Free Radi Antioxidants.* 2012; 2(4):62–67.
- [41] Anusha C, Sumathi T, Joseph LD. Protective role of apigenin on rotenone induced rat model of Parkinson's disease: Suppression of neuroinflammation and oxidative stress mediated apoptosis, *Chem Biol Interact.* 2017; 269:67-79.
- [42] Gulcin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-di-hydroxycinnamic acid). *Toxicology.* 2006; 217, 213–220.
- [43] Joshi R, Gangabhairathi S, Venu S, Adhikari T. Antioxidant activity and free radical scavenging reactions of gentisic acid: in-vitro and pulse radiolysis studies. *Free Radic Res.* 2012; 46(1): 11–20.
- [44] Wang J, Fang X, Ge L, Cao F, Zhao L, Wang Z, Xiao W. Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol. *PLoS ONE.* 2018; 13(5): e0197563.
- [45] Schlernitzauer A, Oiry C, Hamad R, Galas S, Cortade F, Chabi B, Casas F, Pessemesse L, Fouret G, Feillet-Coudray C, Cros G, Cabello G, Magous R, Wrutniak-Cabello C. Chicoric Acid is an Antioxidant Molecule That Stimulates AMP Kinase Pathway in L6 Myotubes and Extends Lifespan in *Caenorhabditis elegans* *PLoS One.* 2013; 8(11):e78788.
- [46] Yang J, Guo J, Yuan J. *In vitro* antioxidant properties of rutin. *LWT -Food Science and Technology.* 2008; 41(6): 1060-1066.
- [47] Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytother Res.* 2015; 29:323-31.
- [48] Xican Li, Xiaozhen Wang, Dongfeng Chen, Shuzhi Chen. Antioxidant Activity and Mechanism of Protocatechuic Acid *in vitro* *Functional Foods in Health and Disease.* 2011; 7:232-244.

[49] Kakkar S, Bais S. A review on protocatechuic Acid and its pharmacological potential. *ISRN Pharmacol.* 2014; 2014:952943.

[50] Ha JH, Lee DU, Lee JT, Kim JS, Yong CS, Kim JA, Ha JS, Huh K. 4-Hydroxybenzaldehyde from *Gastrodia elata* B1. is active in the antioxidation and GABAergic neuromodulation of the rat brain. *Journal of Ethnopharmacology.* 2000; 73(1-2), 329–333.

[51] Adomako-Bonsu AG, Chan SLF, Pratten M, Fry JR. Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: importance of physico-chemical characteristics. *Toxicology in Vitro.* 2017; 40:248–255.

Évaluation du dysfonctionnement mitochondrial et des marqueurs apoptotiques

Après avoir pénétré dans les neurones, la ROT agit comme un inhibiteur spécifique du complexe mitochondrial I, et active les caspases mitochondriales qui induisent l'apoptose (activation de la voie intrinsèque apoptotique). Plus précisément, l'activité du C I altérée améliore la formation des ERO dans la matrice mitochondriale, ce qui augmente la perméabilité de la membrane externe via l'ouverture des pores de transition, et provoque la libération des facteurs apoptogènes mitochondriaux tels que le Cyt C dans le cytosol pour activer la caspase-3. Cette perméabilisation qui représente le point de non-retour dans la voie apoptotique mitochondriale, est fortement régulée par les anti-apoptotiques (par exemple, Bcl-2) et pro-apoptotiques (par exemple, Bax) de la famille Bcl-2 [1]. Des études précédentes ont rapporté que la ROT a causé la mort cellulaire par la modulation des membres de la famille Bcl-2 [2]. Conformément aux rapports ci-dessus, nous avons constaté que le traitement par la ROT a augmenté l'expression de Bax et de la caspase-3. Le traitement par l'extrait *n*-BuOH a démontré que l'activité anti-apoptotique pourrait avoir un rôle dans la préservation des cellules dopaminergiques et la prévention du processus neurodégénératif détecté dans cette étude, où une augmentation du C I et une diminution du rapport Bax/Bcl2 et de la caspase-3 ont été rapportées [2]. L'examen histopathologique des coupes de cerveaux a révélé que l'injection de roténone était associée à des changements neuropathologiques remarquables [3].

Des études antérieures ont montré que les mitochondries sont des cibles principales plausibles des flavonoïdes qui préviennent efficacement les déficits mitochondriaux, l'apoptose et le stress oxydatif. Prenant ces données ensemble, on peut récapituler que l'extrait *n*-BuOH comprend des composés polyphénoliques qui ont de nombreuses propriétés bénéfiques. L'acide chlorogénique a été signalé comme un réducteur des troubles moteurs et possède un effet protecteur sur les neurones dopaminergiques nigraux dans le modèle 6-hydroxydopamine de la MP [4, 5]. L'acide caféique empêche la neurodégénérescence induite par la ROT dans le cerveau et le plexus myentérique [6]. L'acide protocatéchuic améliore les effets neuroprotecteurs grâce à une combinaison d'activités antioxydantes et anti-inflammatoires [7]. L'acide gentisique a produit une activité neuroprotectrice

dose-dépendante dans différents modèles animaux de la MP [8]. L'acide chicorique a régulé la voie de signalisation du stress oxydatif par l'expression régulée des enzymes de défense antioxydantes [9]. L'effet neuroprotecteur de la rutine a été démontré dans différentes études et peut ralentir la progression de la MP [10]. Le potentiel neuroprotecteur de l'hespéridine a été engendré par l'amélioration des facteurs de croissance neuronaux et des fonctions de défense antioxydantes endogènes, en diminuant les voies neuro-inflammatoires et apoptotiques [11, 12]. Le kaempférol a montré des propriétés anti-parkinsoniennes à travers l'amélioration de la coordination motrice, l'augmentation de la DA striatale et la prévention de la perte de tyrosine hydroxylase [13]. L'apigénine a supprimé l'apoptose induite par la neuroinflammation et le stress oxydatif dans le modèle de rat parkinsonien induit par la ROT [14]. Plusieurs études suggèrent que les interactions synergiques des produits naturels peuvent être efficaces pour traiter des maladies telles que la MP [15].

Évaluation de la neuroinflammation induite par la ROT *in vivo*

Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer la neurotoxicité induite par la ROT, mais le mécanisme exact reste une source de débat. Un de ces mécanismes est la neuroinflammation, qui est caractérisée par des cellules microgliales activées [16, 17]. Des études antérieures ont rapporté que la ROT a la capacité d'activer la microglie *in vivo*. L'augmentation des niveaux de l'activité de la MPO est une caractéristique distinctive des cellules gliales exposées à la ROT. Ce qui a été confirmé dans les résultats de notre travail. Aussi, un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires est libérées par la cellule microgliale activée, telles que le TNF- α qui joue un rôle important dans la médiation de la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques [18]. Les cytokines peuvent se lier à leurs récepteurs respectifs, et activer des voies de transduction, conduisant à l'activation de NF- κ B et finalement à l'apoptose [19]. Il a été rapporté que le NF- κ B est présent avant la caspase-3, ce qui suggère que les superoxydes et les cytokines produites par l'activation de la microglie par la ROT jouent un rôle dans l'activation de NF- κ B avant que l'inhibition du C I déclenche l'activation de caspase-3 (apoptose). Cependant, un excès des ERO dans le cytoplasme en raison de l'inhibition du C I pourrait avoir comme résultat le croisement des ERO dans le cytoplasme via des canaux anioniques dépendants de la tension, ce qui pourrait également aider à activer le NF- κ B [19]. Dans la présente étude, la ROT a amélioré la sécrétion de TNF- α dans le cerveau du rat en comparaison avec le ~~contrôle~~, ce qui est cohérent avec l'étude précédente [20]. Le NO a des fonctions régulatrices dans les cellules, mais il semble être une neurotoxine dans des conditions de production excessive [21]. Le NO, généré par la forme inducible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) dans les cellules gliales ou la forme neuronale (nNOS), peut jouer un rôle clé dans la cascade d'événements conduisant à la dégénérescence des

neurones [22]. La ROT provoque une augmentation de l'activité enzymatique de la NOS dans le ST et la SNpc, ce qui aggrave l'état de stress oxydatif [23]. Dans notre étude, des rats ayant reçu de la ROT ont augmenté les niveaux de NO, ce qui est corroboré par des études antérieures [22, 24]. Le TNF- α peut également induire les astrocytes pour libérer le glutamate et d'autres substances neurotoxiques, et peut favoriser la sécrétion de NO en augmentant l'expression de la forme inductible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) dans les cellules gliales, qui peuvent jouer un rôle clé dans la cascade d'événements conduisant à la dégénérescence des neurones [22, 24]. Pour cette raison, la modulation des médiateurs inflammatoires avec des substances naturelles pourrait être une autre voie intéressante vers un effet neuroprotecteur. Dans la présente étude, le co-traitement de la ROT avec l'extrait *n*-BuOH a significativement atténué la génération de ces médiateurs pro-inflammatoires (TNF- α , NO, MPO). Ceci pourrait expliquer l'activité anti-inflammatoire de l'extrait *n*-BuOH, en accord avec les résultats d'une étude antérieure sur l'effet anti-inflammatoire de *C. africana* [25]. Dans la présente étude, le profil chimique obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) confirme la présence de plusieurs constituants polyphénoliques dotés d'une activité anti-inflammatoires.

Références bibliographiques

- [1] Anwar Norazit, George Mellick, Adrian CB. Meedeniya (2012). Oxidative Stress in Parkinson's Disease; Parallels Between Current Animal Models, Human Studies and Cells, Oxidative Stress and Diseases, Dr. Volodymyr Lushchak (Ed.), ISBN: 978-953-51-0552-7, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-diseases/oxidative-stress-in-parkinson-s-diseaseparallels-between-current-animal-models-human-studies-a>.
- [2] Sun H, He X, Liu C, Li L, Zhou R, Jin T, Yue S, Feng D, Gong J, Sun J, Ji J, Xiang L. Effect of Oleracein E, a Neuroprotective Tetrahydroisoquinoline, on Rotenone-Induced Parkinson's Disease Cell and Animal Models. ACS Chem Neurosci. 2017; 8(1):155-164.
- [3] Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. J Biol Chem. 2003; 278(10):8516-25.
- [4] Dehnad S, Kiasalari Z, Roghani M. Protective effect of chlorogenic acid in an experimental model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine in rats. JSSU. 2019; 27(1):1118-1127.
- [5] Singh SS, Rai SN, Birla H, Zahra W, Kumar G, Gedda MR, Tiwari N, Patnaik R, Singh RK, Singh SP. Effect of chlorogenic acid supplementation in MPTP-intoxicated mouse. Front Pharmacol. 2018; 9:757.

- [6] Miyazaki I, Isooka N, Wada K, Kikuoka R, Kitamura Y, Asanuma M. Effects of enteric environmental modification by coffee components on neurodegeneration in rotenone-treated mice. *Cells*. 2019; 8(3):E221.
- [7] Krzysztoforska K, Mirowska-Guzel D, Widy-Tyszkiewicz E. Pharmacological effects of protocatechuic acid and its therapeutic potential in neurodegenerative diseases: Review on the basis of *in vitro* and *in vivo* studies in rodents and humans. *Nutr Neurosci*. 2019; 22(2):72-82.
- [8] Kabra MP, Bhandari SS, Sharma A, Gupta RB. Evaluation of anti-parkinson's activity of gentisic acid in different animal models. *J Acute Dis*. 2014; 3:141-144.
- [9] Wang Y, Diao Z, Li J, Ren B, Zhu D, Liu Q, Liu Z, Liu X. Chicoric acid supplementation ameliorates cognitive impairment induced by oxidative stress via promotion of antioxidant defense system. *RSC Adv*. 2017; 7(57):36149-36162.
- [10] Sharma S, Narang JK, Ali J, Baboota S. Synergistic antioxidant action of vitamin E and rutin SNEDDS in ameliorating oxidative stress in a Parkinson's disease model. *Nanotechnology*. 2016; 27(37): 375101.
- [11] Hajialyani M, HoseinFarzaei M, Echeverría J, Nabavi SM, Uriarte E, Sobarzo-Sánchez E. Hesperidin as a Neuroprotective agent: A review of animal and clinical evidence. *Molecules*. 2019; 24(3), 648.
- [12] Antunes MS, Goes ATR, Boeira SP, Prigol M, Jesse CR. Protective effect of hesperidin in a model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine in aged mice. *Nutrition*. 2014; 30(11-12):1415–1422.
- [13] Ablat N, Lv D, Ren R, Xiaokaiti Y, Ma X, Zhao X, Sun Y, Lei H, Xu J, Ma Y, Qi X, Ye M, Xu F, Han H, Pu X. Neuroprotective Effects of a Standardized Flavonoid Extract from Safflower against a Rotenone-Induced Rat Model of Parkinson's Disease. *Molecules*. 2016; 21(9):1107.
- [14] Anusha C, Sumathi T, Joseph LD. Protective role of apigenin on rotenone induced rat model of Parkinson's disease: Suppression of neuroinflammation and oxidative stress mediated apoptosis, *Chem Biol Interact*. 2017; 269:67-79.
- [15] Zhang Z, Li G, Szeto SSW, Chong CM, Quan Q, Huang C, Cui W, Guo B, Wang Y, Han Y, Michael Siu KW, Yuen Lee SM, Chu IK. Examining the neuroprotective effects of protocatechuic acid and chrysin on *in vitro* and *in vivo* models of Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*. 2015; 84:331–343.
- [16] Farooqui T, Farooqui AA. Lipid-mediated oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*. 2011; 2011:247467.
- [17] Ye L, Huang Y, Zhao L, Li Y, Sun L, Zhou Y, Qian G, Zheng JC. Il-1beta and tnf-alpha induce neurotoxicity through glutamate production: A potential role for neuronal glutaminase. *J Neurochem*. 2013; 125, 897–908.

- [18] Ransoho, RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* 2016, 353, 777–783.
- [19] Wang X, Qin ZH, Leng Y, Wang Y, Jin X, Chase TN, Bennett MC. Prostaglandin A1 inhibits rotenone-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* 2002; 83:1094-102.
- [20] Ameen AM, Elkazaz AY, Mohammad HMF, Barakat BM. Anti-inflammatory and neuroprotective activity of boswellic acids in rotenone parkinsonian rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2017; 95(7):819-829. doi: 10.1139/cjpp-2016-0158.
- [21] Abdel Moneim AE, Dkhil MA, Al-Quraishy S. Effects of flaxseed oil on lead acetate-induced neurotoxicity in rats. *BiolTrace Elem Res.* 2011; 144(1–3):904–913.
- [22] Bashkatova V, Alam M, Vanin A, Schmidt WJ. Chronic administration of rotenone increases levels of nitric oxide and lipid peroxidation products in rat brain. *Exp. Neurol.* 2004; 186:235 – 241.
- [23] He Y, Imam SZ, Dong Z, Jankovic J, Ali SF, Appel SH, Le W. Role of nitric oxide in rotenone-induced nigro-striatal injury. *J Neurochem.* 2003; 86:1338–1345.
- [24] Khadrawy YA, Salem AM, El-Shamy KA, Ahmed EK, Fadel NN, Hosny EN. Neuroprotective and therapeutic effect of caffeine on the rat model of Parkinson's disease induced by rotenone. *J Diet Suppl.* 2017; 14(5):553–572.
- [25] Zaouani M, Bitam A, Baz A, Benali Y, Mahdi MHB. *In vivo* evaluation of wound healing and anti-inflammatory activity of methanolic extract of roots of *Centaurea africana* (L.) in a topical formulation. *Asian J Pharm Clin Res.* 2017; (10):341-346.

Conclusion et perspectives :

La partie expérimentale nous a permis de répondre aux différentes hypothèses soulevées dans l'introduction et de formuler une conclusion stipulant que l'extrait *n*-BuOH de la plante *C. africana* à (200 mg/kg) agit via plusieurs mécanismes dans la modulation de la neurotoxicité et de l'apoptose induits par la roténone comme modèle de MP. Les résultats obtenus dans cette partie démontrent que les extraits *n*-BuOH et EtOAc de *C. africana* renferment des flavonoïdes et des composés phénoliques.

L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* (pouvoir antiradicalaire et réducteur, et inhibition de LPO) des extraits étudiés a permis de mettre en évidence une corrélation entre les polyphénols présents dans les extraits et leur activité antioxydante. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire élucidé via l'effet scavenger du NO et le test de l'œdème induit par la carragénine a permis de conclure que l'effet anti-inflammatoire est plus prononcé par l'extrait *n*-BuOH que par l'extrait EtOAc. Le prétraitement des rats par l'extrait *n*-BuOH confirme que cet extrait a un effet anti-inflammatoire significatif en conservant les taux de la MPO et du MDA.

Afin d'évaluer la capacité neuroprotectrice de l'extrait *n*-BuOH vis-a-vis la maladie de Parkinson provoqué chez le rat, nous avons déclenché un phénotype de MP chez le rat par un traitement prolongé par la roténone à faible dose.

L'exposition des rats à la roténone a entraîné une altération du statut oxydant/antioxydant, un dysfonctionnement mitochondriale, une neuroinflammation et une altération des marqueurs neurochimiques. La co-administration de l'extrait *n*-BuOH a permis d'améliorer ces paramètres et donc de protéger les cellules nerveuses des effets induits par la roténone.

D'après nos résultats, il est clair que la ROT a induit une réduction marquée de la dopamine et une suractivité du glutamate qui a provoqué une excitotoxicité, le co-traitement de ROT avec l'extrait *n*-BuOH de *C. africana* a entraîné une restauration significative du niveau de la dopamine et une diminution du glutamate comparativement à la L-Dopa.

Les dommages oxydatifs, qui sont produits avant le développement des lésions dopaminergiques nigrostriatales, peuvent aussi jouer un rôle principal dans la neurodégénération induite par la ROT.

Le traitement par l'extrait *n*-BuOH a été associé à une restauration de l'activité de la PON1 et à la suppression des taux excessifs de LPO; effets susceptible d'être une conséquence de l'action neuroprotective de l'extrait chez le rat parkinsonien. Nos résultats montrent également que le co-traitement avec l'extrait *n*-BuOH semble être en mesure d'équilibrer l'activité antioxydante endogène en améliorant les niveaux de GSH et en restituant l'activité des GPx, GR et GST. Lors de l'évaluation du stress oxydatif mitochondrial qui a été effectuée sur des mitochondries du cerveau

des rats traités par la ROT. Nos résultats ont révélé que l'extrait *n*-BuOH administré oralement (200 mg/kg) aux rats co-traités avec la ROT protège les mitochondries en préservant le taux du GSH et l'activité des Mn-SOD et GPx mitochondriales

La modulation des médiateurs inflammatoires avec des substances naturelles pourrait être une autre voie intéressante vers un effet neuroprotecteur. Dans la présente étude, le co-traitement de la ROT avec l'extrait *n*-BuOH a significativement atténué la génération de ces médiateurs pro-inflammatoires (TNF- α , NO, MPO) comparativement à la L-dopa.

Le traitement par l'extrait *n*-BuOH de *C. africana* a démontré que l'activité anti-apoptotique a prouvé un rôle dans la préservation des cellules dopaminergiques et la prévention du processus neurodégénératif, où une augmentation du C1 et une diminution du rapport Bax/Bcl2 et de la caspase-3 ont été rapportées. Le traitement par l'extrait *n*-BuOH a amélioré les altérations histopathologiques induites par la roténone.

Prenant ces données ensemble, on peut récapituler que l'extrait *n*-BuOH comprend des composés polyphénoliques qui dotés de nombreuses propriétés bénéfiques. L'acide chlorogénique qui a été signalé comme un réducteur des troubles moteurs et possède un effet protecteur sur les neurones dopaminergiques est mentionné pour la première fois au niveau de l'extrait *n*-BuOH de *C. africana*. Le profil chimique obtenu par la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) confirme la présence de plusieurs constituants polyphénoliques doués d'une activité anti-inflammatoires et antioxydantes dont les plus abondants et les plus puissants sont l'acide chlorogénique, l'acide *p*-hydroxybenzoïque et les deux dérivés d'apigénine purifiés, les interactions synergiques possibles de ces composés phénoliques pourraient avoir plusieurs propriétés qui peuvent être bénéfiques pour la MP.

Des travaux plus approfondis sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'effet neuroprotecteur de la plante. De plus, l'étude de la biodisponibilité des extraits et en particulier la capacité des substances détectées dans nos expériences à franchir la BHE pourra nous aider à identifier des composés thérapeutiques pouvant réduire le stress oxydatif et les processus neuroinflammatoire et apoptotique responsable de la mort neuronale observée dans la MP.