

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

Faculté Des Sciences Exactes et de l'Informatique

DEPARTEMENT DE CHIMIE



UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

Filière : Chimie

Laboratoire Structure Élaboration et Application des Matériaux Moléculaires (SEA2M)

THÈSE

**PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT
EN SCIENCES**

Par

Mme YAHIAOUI Hassiba

Thème

**Pouvoir Antioxydant et Neuroprotecteur de
Quelques Plantes Algériennes**

Soutenue publiquement le :

devant le jury :

Président BENDERDOUCHE Nouredine

Directeur de thèse M'HAMEDI Ahmed

Examineur BENALI Mohamed

Examineur MEZIANE Malika

Pr Université de Mostaganem

MCA Université de Mostaganem

Pr Université Sidi Belabes

MCA Université de Chlef

Année universitaire : 2018-2019

Remerciements

La première partie de cette thèse a été effectuée au Laboratoire Structure Elaboration et Application des matériaux moléculaires (SEA2M) site 2, de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem. Par contre, la deuxième partie a été réalisée au laboratoire de Neuropharmacologie du **Professeur P. Chazot** du département de biologie et des sciences biomédicales, université de Durham (grande Bretagne).

L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par **Mr. A. M'HAMEDI**, Professeur de chimie à la Faculté des sciences et de la technologie de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem. Je tiens à lui exprimer, vivement, ma profonde reconnaissance pour son entière disponibilité, sa patience et tout l'intérêt porté pour le sujet de recherche.

Je tiens à remercier Monsieur le **Professeur P.L. Chazot** de l'université de Durham pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour le précieux soutien matériel qu'il m'avait accordé le long de mon séjour.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur **S. NEMMICHE**, Professeur à l'université de Mostaganem pour les services rendus au cours de la préparation de cette thèse et pour toute l'attention portée à ce travail.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur **N. BENDERDOUCHE** de l'université de Mostaganem Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury. Qu'il trouve ici tout mon respect et ma sincère gratitude.

Mes remerciements vont également à Monsieur **M. BENALI**, Professeur à l'Université de sidi Belabes, d'avoir ménagé son temps pour juger et critiquer ce travail. Je suis particulièrement reconnaissante et honorée par sa participation à ce jury.

Que Madame **M. MEZIANE**, Maitre de Conférence A à l'Université de Chlef, trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements, de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury en qualité d'examinatrice.

Je remercie mes collègues et amies pour leur aide et soutien : Samuelle, Chouchouta (Université de Durham), Mohamed el amine, Karima, Hanane, Kheira, Meriem, Asma, Drifa,

Abdelhghani, Djillali, Jahira, Aicha, Abed, Fatima, Hakim sans oublier Hassna, notre ingénieur de laboratoire (SEA2M).

Pour terminer, je dédie ce manuscrit tout particulièrement à mes parents pour leur soutien et leur amour, ce qui m'a permis d'aboutir dans mes travaux de doctorat. Que dieu les préserve et les protège.

A mes chers enfants Yahia, Mohamed et Idriss pour la joie qu'ils me procurent.

Mes pensées vont à mes frères et sœur, Mourad, Kamel et Asma pour leur encouragement.

J'adresse un clin d'œil à mes belles sœurs, mon beau frère, mes neveux et nièces.

Mme YAHIAOUI Hassiba

Sommaire

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	1

Partie Bibliographique

Chapitre 1. Maladies neurodégénératives et plantes médicinales.

1.1. Maladies neurodégénératives (MND)	3
1.2. Causes des maladies neurodégénératives	3
1.2.1. Génétique	4
1.2.2. Agrégation de protéines toxiques (tau, A β , α -synucleine, huntingtine)	4
1.2.3. Augmentation de l'apoptose	6
1.2.4. Augmentation du stress oxydant (voir chapitre 2)	7
1.2.5. Dysfonctionnement du système ubiquitine-protéasome	7
1.2.6. Inflammation	7
1.2.7. Excitotoxicité	8
1.2.8. Dysfonctionnement mitochondrial	8
1.2.9. Facteurs environnementaux	8
1.3. Plantes médicinales ciblées	9
1.3.1. Introduction	9
1.3.2. <i>Anacyclus Pyrethrum</i> L.	9
1.3.2.1. Généralités	9
1.3.2.2. Dénominations vernaculaires	10
1.3.2.3. Situation botanique de l'espèce <i>Anacyclus pyrethrum</i> L.	10
1.3.2.4. Utilisation médicinale	10
1.3.2.5. Composition chimique	11
1.3.3. <i>Artemisia absinthium</i> L.	13
1.3.3.1. Généralités	13
1.3.3.2. Dénominations vernaculaires	15
1.3.3.3. Situation botanique de l'espèce <i>Artemisia absinthium</i> L.	15
1.3.3.4. Utilisation médicinale	15
1.3.3.5. Composition chimique	16
1.3.4. <i>Urtica urens</i> L.	16
1.3.4.1. Généralités	16
1.3.4.2. Dénominations vernaculaires	17
1.3.4.3. Situation botanique de l'espèce <i>Urtica urens</i> L.	17
1.3.4.4. Utilisations médicinales	17
1.3.4.5. Composition chimique	18

Partie Expérimentale

Chapitre 4 : Matériel et méthodes

4.1. Matériel végétal.....	64
4.2. Préparation des extraits.....	64
4.2.1. Extrait aqueux.....	64
4.2.2. Extrait méthanolique.....	64
4.3. Détermination de la teneur totale en polyphénols.....	64
4.4. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes.....	65
4.5. Détermination de l'activité antioxydante des différents extraits.....	65
4.5.1. Activité de piégeage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle.....	65
4.5.2. Estimation du pouvoir réducteur de l'extrait.....	65
4.6. Analyse statistique.....	66
4.7. Tests de Neurotoxicité.....	66
4.7.1. Cellules CAD.....	66
4.7.2. Différentiation et la dédifférenciation des cellules CAD.....	67
4.7.3. Applications des cellules CAD.....	69
4.7.4. Culture de cellules CAD.....	69
4.7.5. Subculture de la lignée cellulaire CAD.....	69
4.7.6. Cryoconservation et stockage de la lignée cellulaire CAD.....	69
4.7.7. Ressuscitation de la lignée cellulaire congelée.....	70
4.7.8. Test de neurotoxicité (essai du MTT ou test de viabilité cellulaire).....	70
4.8. Test de neuroprotection.....	71
4.9. Analyse statistique.....	72
4.10. Essai de l'imagerie du calcium.....	72
4.10.1. Méthodologie.....	72
4.10.2. Analyse des données.....	73
4.11. Détermination de la composition chimique de <i>Anacyclus pyrethrum</i> L. par HPLC-UV-MS/MS.....	73
4.11.1. Appareil HPLC.....	73
4.11.2. Phase stationnaire.....	73
4.11.3. Chasse mobile.....	73
4.11.4. Conditions chromatographiques.....	74

Chapitre 5 : Résultats et discussion

5.1. Détermination de la quantité totale des polyphénols.....	75
5.2. Détermination de la quantité totale des flavonoïdes.....	75
5.3. Détermination de l'activité antioxydante des différents extraits.....	80
5.3.1. Activité du piégeage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH).....	80
5.3.2. Test du pouvoir réducteur.....	88
5.4. Test de Neurotoxicité : traitement des cultures cellulaires CAD avec les extraits des plantes (<i>Anacyclus pyrethrum</i> L., <i>Artemisia absinthium</i> L. et <i>Urtica urens</i> L.).....	92
5.5. Test de neuroprotection : traitement des cultures cellulaires CAD avec les extraits des plantes (<i>Anacyclus pyrethrum</i> L., <i>Artemisia absinthium</i> L. et <i>Urtica urens</i> L.).....	98
5.6. Essai d'imagerie du calcium.....	109
5.6.1. Signalisation fonctionnelle des extraits aqueux et méthanoliques de <i>A. pyrethrum</i> L. utilisant l'imagerie du calcium.....	111
5.6.1.1. Effet des extraits aqueux et méthanolique de <i>A. pyrethrum</i> L. sur.....	

la mobilisation du calcium dans les cellules CAD au moment de l'injection de l'extrait.....	111
5.6.1.2. Effet des extraits aqueux et méthanolique de <i>A. pyrethrum</i> L. sur la mobilisation du calcium durant la dépolarisation (50 mM KCl) des cellules CAD.....	112
5.6.2. Signalisation fonctionnelle des extraits aqueux et méthanoliques de <i>A. absinthium</i> L. utilisant l'imagerie du calcium.....	114
5.6.2.1. Effet des extraits aqueux et méthanolique de <i>A. absinthium</i> L. sur la mobilisation du calcium dans les cellules CAD au moment de l'injection de l'extrait.....	114
5.6.2.2. Effet des extraits aqueux et méthanolique de <i>A. absinthium</i> L. sur la mobilisation du calcium durant la dépolarisation (50 mM KCl) des cellules CAD.....	115
5.6.3. Signalisation fonctionnelle des extraits aqueux et méthanoliques de <i>U. urens</i> L. utilisant l'imagerie du calcium.....	117
5.6.3.1. Effet des extraits aqueux et méthanolique de <i>U. urens</i> L. sur la mobilisation du calcium dans les cellules CAD au moment de l'injection de l'extrait.....	117
5.6.3.2. Effet des extraits aqueux et méthanolique de <i>U. urens</i> L. sur la mobilisation du calcium durant la dépolarisation (50 mM KCl) des cellules CAD.....	118
5.7. Caractérisation biochimique de l'extrait aqueux de <i>Anacyclus pyrethrum</i> L.	125
Conclusion.....	134
Références bibliographiques.....	138
Annexes.....	164
Travaux scientifiques.....	165

Résumé

Notre travail de recherche porte sur l'étude de l'activité antioxydante et neuroprotectrice des extraits aqueux et méthanoliques des racines de *Anacyclus pyrethrum* L. et des feuilles de *Artemisia absinthium* L. et de *Urtica urens* L. utilisés en médecine traditionnelle.

La quantification des phénols totaux par la méthode du Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes par la technique du trichlorure d'aluminium, révèle le contenu en polyphénols compris entre $12,33 \pm 5,85$ et $36,66 \pm 5,25$ μg EAG/mg d'extrait. La quantité des polyphénols la plus élevée est présente dans les extraits méthanoliques des trois plantes. Les teneurs en flavonoïdes exprimées en équivalent de quercétine sont de l'ordre de $0,49 \pm 0,088$ à $28,91 \pm 2,34$ μg EQ/mg d'extrait. La quantité des flavonoïdes été aussi plus élevée dans les extraits alcooliques sauf pour *A. pyrethrum* L. où l'extrait aqueux contenait une teneur en flavonoïdes nettement plus élevée ($p < 0.001$).

L'activité antioxydante des six extraits est évaluée par deux méthodes différentes. La première est celle du radical libre DPPH. Les concentrations ayant conduit à une inhibition de 50% de ce radical sont désignées par l'IC₅₀. Les six extraits aqueux et méthanoliques des trois plantes ont montré une activité anti-radicalaire ; les extraits ont exhibé une activité de piégeage du radical de façon proportionnelle avec les concentrations testées. La deuxième méthode d'évaluation de l'activité antioxydante est celle du pouvoir réducteur. Les six extraits ont révélé un pouvoir réducteur proportionnel à leurs concentrations.

La toxicité des extraits aqueux et méthanoliques de *A. pyrethrum* L., *A. absinthium* L. et *U. urens* L. a été testée sur des cellules CAD par le test de viabilité cellulaire (MTT). Des concentrations de 0,1 à 0,0001 mg/ml d'extrait aqueux et méthanolique de *A. pyrethrum* L. et de *A. absinthium* L. n'ont induit aucun effet neurotoxique sur les cellules CAD. Chez l'espèce *Urtica urens* L., à des concentrations de 0.1 à 1 mg/ml d'extrait méthanolique et aqueux, aucune neurotoxicité n'a été observée chez les cellules CAD ($p > 0.05$). Les effets du peroxyde d'hydrogène sur les cellules CAD ont été étudiés.

Un effet neuroprotecteur clair ($p < 0.01$) a été observé avec l'extrait aqueux des racines de *A. pyrethrum* L. à la concentration de 0.1mg/ml, en revanche aucun effet de cet extrait n'a été remarqué à la concentration de 0.01mg/ml. Par ailleurs, les extraits aqueux et méthanoliques des feuilles de *A. absinthium* L. et de *U. urens* L. n'ont montré aucun effet neuroprotecteur ($p > 0.05$) sur les cellules CAD traitées au peroxyde d'hydrogène.

Les ions Ca^{2+} génèrent une multitude de signaux intracellulaires qui contrôlent des fonctions clés dans les neurones mais une dyshoméostasie calcique peut être décisive pour ces cellules allant jusqu'à leur mort. Par conséquent si, à la suite d'une dépolarisation ou tout autre stimuli, un extrait végétale empêcherait l'augmentation excessive de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les neurones par son entrée à travers les canaux calciques, cela contribuerait à l'action neuroprotectrice de cet extrait. C'est dans ce sens que notre étude a été dirigée et l'effet des extraits aqueux et méthanoliques des racines de *Anacyclus pyrethrum* L., des feuilles de *Artemisia absinthium* L. et de *Urtica urens* L., sur les concentrations intracellulaires de Ca^{2+} libre des cellules neuronales cultivées de souris CAD, avant et durant la dépolarisation au KCl, a été enregistré.

Contrairement à l'extrait méthanolique de *A. pyrethrum* L. qui a significativement supprimé la réponse à la dépolarisation, l'extrait aqueux semble étendre cette dernière. Les extraits aqueux et méthanoliques de *A. absinthium* L. (0.1mg/ml) ont complètement supprimé la réponse à la dépolarisation induite par le KCl, par rapport au contrôle.

Cependant, l'extrait aqueux et méthanolique de *U. urens* L. (0,1 mg/ml) ont fortement réduit la réponse à la dépolarisation induite par le KCl par rapport au contrôle.

L'analyse haute résolution LC-UV-MS/MS a révélé la détection des différentes classes de composés dans les extraits aqueux et méthanoliques de *A. pyrethrum* L. entre autre les acides caféoylquiniques, la N-feruloyltyramine et les alcaloïdes.

Mots clés: Maladies neurodégénératives ; Plantes médicinales ; Polyphénols ; Flavonoïdes ; Activité antioxydante ; Cytotoxicité ; Neuroprotection ; Signal calcique.

Summary

Our research focuses on the study of antioxidant and neuroprotective activity of aqueous and methanolic extracts of the roots of *Anacyclus pyrethrum* L. and leaves of *Artemisia absinthium* L. and *Urtica urens* L. used in traditional medicine.

The quantification of total phenols by the Folin-Ciocalteu method and flavonoids by the aluminium trichloride technique reveals the polyphenol content between 12.33 ± 5.85 and 36.66 ± 5.25 μg EAG/mg of extract. The highest amount of polyphenols is present in the methanolic extracts of the three plants. The flavonoids content expressed as quercetin equivalents are of the order of 0.49 ± 0.088 to 28.91 ± 2.34 μg EQ/mg of extract. The amount of flavonoids was also higher in alcoholic extracts except for *A. pyrethrum* L. where the aqueous extract contained significantly higher flavonoids content ($p < 0.001$).

The antioxidant activity of the six extracts is evaluated by two different methods. The first is that of the free radical DPPH. The concentrations which led to a 50% inhibition of this radical are designated IC_{50} . The six aqueous and methanolic extracts of the three plants showed anti-radical activity; the extracts exhibited a radical scavenging activity proportionally with the concentrations tested. The second method of evaluating the antioxidant activity is that of the reducing power. The six extracts revealed a reducing power proportional to their concentrations.

The toxicity of aqueous and methanolic extracts of *A. pyrethrum*, *A. absinthium* L. and *U. urens* L. was tested on CAD cells by the Cell Viability Test (MTT). Concentrations of 0.1 to 0.0001 mg / ml aqueous and methanolic extract of *A. pyrethrum* L. and *A. absinthium* L. did not induce any neurotoxic effect on CAD cells. In the *U. urens* L. species, at concentrations of 0.1 to 1 mg/ml of methanolic and aqueous extract, no neurotoxicity was observed in CAD cells ($p > 0.05$). The effects of hydrogen peroxide on CAD cells have been studied. A clear neuroprotective effect ($p < 0.01$) was observed with aqueous *A. pyrethrum* L. root extract. At the concentration of 0.1mg/ml, however no effect of this extract was observed at the concentration of 0.01mg/ml. On the other hand, the aqueous and methanolic extracts of *A. absinthium* L. and *U. urens* L. showed no neuroprotective effect ($p > 0.05$) on hydrogen peroxide-treated CAD cells.

Ca^{2+} ions generate a multitude of intracellular signals that control key functions in neurons but calcium dyshomeostasis can be decisive for these cells until they die. Therefore, as a result of depolarization or any other stimuli, a plant extract would prevent the excessive increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in neurons by its entry through the calcium channels, this would contribute to the neuroprotective action of this extract. In this sense our study was directed to the effect of aqueous and methanolic extracts of *Anacyclus pyrethrum*'s roots, *Artemisia absinthium*'s and *Urtica urens*'s leaves, on the intracellular concentrations of free Ca^{2+} of neuronal cells. CAD mouse cultures before and during KCl depolarization were recorded. Unlike, the methanolic extract of *A. pyrethrum* which significantly suppressed the response under depolarization. The aqueous extract seems to extend the latter. Aqueous and methanolic extracts of *A. Absinthium* L. (0.1mg/ml) completely decreased the response to KCl-induced depolarization compared to control. However, the aqueous and methanolic extract of *U. urens* L. (0.1 mg/ml) significantly reduced the response to KCl-induced depolarization compared to control.

High-resolution analysis LC-UV-MS/MS revealed the detection of the different classes of compounds in the aqueous and methanolic extracts of *A. pyrethrum* L. among others the cafoylquinic acids, the N-feruloyltyramine and the alkaloids.

Key words: Neurodegenerative diseases, Medicinal plants, Polyphenols, Flavonoids Antioxidant activity, Cytotoxicity, Neuroprotection, Calcium signal.

ملخص

يركز بحثنا على دراسة نشاط مضادات الاكسدة الوقاية العصبية لمستخلصات المائية والميتانولية لجذور عاقر قرحة *Anacyclus pyrethrum* L. واوراق *Artemisia absinthium* L. و *L. urens* المستخدمة في الطب التقليدي.

يكشف التقدير الكمي للفينولات الكلية بواسطة طريقة *Folin-Ciocalteu* L. والفلافونويدات بواسطة تقنية كلوريد الالمنيوم عن محتوى الفينولات الكلية ما بين $5,85 \pm 12,33$ و $5,25 \pm 36,66$ ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك | ميلليغرام من المستخلص النباتي. توجد اعلى كمية من الفينولات الكلية في المستخلصات الميتانولية للنباتات الثلاثة. يتراوح محتوى الفلافونويدات المعبر عنه بمكافئ الكرسيتين من $0,49 \pm 0,088$ الى $2,34 \pm 28,91$ ميكروغرام مكافئ الكرسيتين | ميلليغرام من المستخلص النباتي. كانت كمية الفلافونويدات اعلى ايضا في المستخلصات الكحولية باستثناء *Anacyclus pyrethrum* L. حيث يحتوي المستخلص المائي على محتوى الفلافونويدات اعلى بكثير (p). (0.001).

يتم تقييم نشاط مضادات الاكسدة للمستخلصات الستة بطريقتين مختلفتين. الاولى باستعمال الجذر الحر DPPH. تم تحديد التركيزات التي ادت الى تثبيط 50% من هذا الجذر الحر المعبر عنها بIC₅₀. اظهرت المستخلصات المائية والميتانولية الستة للنباتات الثلاث نشاطا مضادا للجذور الحرة، المستخلصات اظهرت نشاطا جذريا في الكسح بالتناسب مع التركيزات التي تم اختبارها. الطريقة الثانية لتقييم نشاط مضادات الاكسدة هي طريقة قدرة الارجاع حيث اظهرت المستخلصات قوة الارجاع تتناسب مع تركيزاتها.

تم اختبار سمية المستخلصات المائية والميتانولية للنباتات الثلاث على خلايا دماغية CAD بواسطة اختبار الحويبة الخلوية (MTT). تركيزات من 0,1 الى 0,0001 ميلليغرام | ميليلتر من المستخلص المائي و الميتانولي ل *Artemisia absinthium* L. و *Anacyclus pyrethrum* L. ليس لها اي تأثير سام على الخلايا الدماغية CAD. في النوع *Urtica urens* L. تركيزات من 0,1 الى 1 ميلليغرام | ميليلتر من المستخلص المائي و الميتانولي لم يكن لها اي سمية على خلايا CAD. تمت كذلك دراسة اثار بيروكسيد الهيدروجين على خلايا CAD حيث لوحظ وجود حماية عصبية واضحة (p) (0,01) بالمستخلص المائي لجذور *Anacyclus pyrethrum* L. بتركيز 0,1 ميلليغرام | ميليلتر في حين ان التركيز 0,01 ميلليغرام | ميليلتر لم يكن له اي تأثير على هذه الخلايا. من ناحية اخرى، المستخلصات المائية والميتانولية ل *Artemisia absinthium* L. و *L. urens* لم تظهر اي حماية عصبية على خلايا CAD المعالجة ببيروكسيد الهيدروجين.

تولد ايونات Ca²⁺ داخل الخلايا عدد كبيرا من الاشارات التي تتحكم في الوظائف الرئيسية للخلايا العصبية لكن اي خلل يحدث في تركيز الكالسيوم الخلوي يمكن ان يكون حاسما بالنسبة لهذه الخلايا يمكن ان يادي بها الى الموت. اذا استطاعت المستخلصات النباتية ان تمنع الزيادة المفرطة للكالسيوم في الخلايا العصبية عن طريق دخوله عبر قنوات الكالسيوم، فان هذا من شأنه ان يساهم في العمل الوقائي لهذا المستخلص. في هذا الاتجاه تم توجيه دراستنا و دراسة تأثير المستخلصات المائية و الميتانولية للأنواع الثلاث على تركيزات الكالسيوم في الخلايا العصبية CAD قبل و بعد الاستقطاب بKCl. على عكس المستخلص الميتانولي ل *Anacyclus pyrethrum* L. الذي قمع بشكل كبير الاستجابة للاستقطاب، المستخلص المائي مدد هذه الاخيرة. المستخلصات المائية و الميتانولية ل *Artemisia absinthium* L. الغت تماما الاستجابة للاستقطاب مقارنة مع الشاهد، اما المستخلصات المائية و الميتانولية ل *Urtica urens* L. قللت بشكل كبير من الاستجابة للاستقطاب للناجمة عن KCl.

التحليل عالي الدقة LC-UV-MS/MS كشف عن وجود فئات مختلفة من المركبات في المستخلصات المائية و الميتانولية ل *Anacyclus pyrethrum* L. كحمض *cafeoylquinique* و *N-feruloyltyramine* و القلويدات.

الكلمات المفتاحية: الأمراض التنكسية العصبية، نباتات طبية، البوليفينول، مركبات الفلافونويد، نشاط مضادات الأكسدة، سمية الخلايا العصبية، إشارة الكالسيوم.

Liste des abréviations

AVC : accident vasculaire cérébral.
AMPA: récepteurs sensibles à l'acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique.
A β : beta amyloïde.
ADN : acide désoxyribonucléique.
ARN : acide ribonucléique.
AGPI : acides gras polyinsaturés.
ACh: acétylcholine.
AChE: acétylcholinestérase.
AD/MA: maladie d'Alzheimer.
ATP : adénosine triphosphate.
APP : protéines précurseurs des amyloïdes.
AP-1 : protéine activateur-1.
BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau.
cAMP : l'adénosine monophosphate cyclique.
CAT : catalase.
Cys :cystéine.
CRAC : activation des canaux Ca^{2+} par l'épuisement des réserves calciques intracellulaires.
CICR : libération du calcium induite par le calcium.
CAD :cellules catécholaminergiques indifférenciées.
[Ca^{2+}]_i: calcium intracellulaire.
COX-1 : cyclooxygénase-1.
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.
EC : épicatechine .
EQ: équivalent de Quercétine.
eNOS : oxyde nitrique synthase endothéliale.
EGCG : épigallocatechine gallate.
GPCR : récepteurs couplés aux protéines G.
GSH : glutathion réduit.
GST : glutathion-S-transférase.
GPx: glutathion peroxydase.
Grx: glutarédoxine.
H₂O₂: peroxyde d'hydrogène.
HD/MH: maladie de Huntington.

HIV : Virus de l'immunodéficience humaine.
iNOS : oxyde nitrique synthase inductible.
IL-1 β : interleukine-1 β .
IL-1/6 : interleukine1-6.
IC₅₀ : concentration inhibitrice à 50 %.
IgG : immunoglobulines.
IP₃R : récepteurs de l'inositol 1,4,5-trisphosphate.
IGluR: récepteurs ionotropes du glutamate.
IRM : imagerie par résonance magnétique.
JNK : kinase N-terminale de c-Jun.
K_v : canaux K⁺ dépendant du voltage.
LTP : potentialisation à long terme.
L-DOPA : 3,4-dihydroxyphénylalanine.
MCP-1 : chemokines.
MCU: uniporter calcium mitochondrial.
mGluR : récepteurs métabotropes du glutamate.
mPTP : pores de perméabilité de transition mitochondriaux.
MDA : malondialdéhyde.
MND : maladies neurodégénératives.
MAPK : protéine kinase activée par les mitogènes.
MAO B: monoamine oxydases B.
MCAO : occlusion de l'artère cérébrale moyenne.
NF- κ B : facteur nucléaire kappa B.
Nrf2 : facteur de transcription.
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide forme réduite.
NO⁺: ions nitrosium .
NO : oxyde nitrique/ monoxyde d'azote.
NMDAR : récepteurs sensibles au N-méthyl-d-aspartate.
nAChR : récepteurs nicotinique de l'acétylcholine.
NOS : oxyde nitrique synthase.
nNOS : oxyde nitrique synthase neuronale.
NOX: NADPH oxydase.
O₂⁻: anion superoxide.

6-OHDA : 6-hydroxydopamine.
PD/MP: maladie de parkinson.
PLC-IP₃: phospholipase C- inositol-1,4,5-
trisphosphate.
PKC: protéine kinase C.
PI3K: phosphoinositide 3-kinase.
PLA2: Phospholipase A2.

PGE2: prostaglandine E2.

ROS : espèces réactives à l'oxygène.
RNS : espèces réactives à l'azote.
ROC : canaux Ca²⁺ opérés par les
récepteurs.
RyR : récepteurs de la ryanodine.
SOC : canaux d'entrée de Ca²⁺ opérés par
les stocks.
SNC : système nerveux central.
SOD : superoxyde dismutase.

SLA : Sclérose latérale amyotrophique.

Trx 2 : thiorédoxine-2.

TRP : récepteurs transitoires potentiels.
TNF- α : facteur de nécrose tumorale.

EAG : équivalent d'acide gallique.

VGCC /VOC : canaux Ca²⁺ dépendant du
voltage.

Liste des tableaux

Tableau 1.	Dosage des polyphénols totaux des racines de <i>A. pyrethrum</i> L. et des feuilles de <i>A. absinthium</i> L. et de <i>U. urens</i> L. (μg d'AGE/mg d'extrait).....	75
Tableau 2.	Dosage des Flavonoïdes totaux des racines de <i>A. pyrethrum</i> et des feuilles de <i>A. absinthium</i> L. et de <i>U. urens</i> L. (en μg équivalent de Quercétine/mg d'extrait végétal).....	75
Tableau 3.	Activité de piégeage du radical libre DPPH par les extraits végétaux et l'acide ascorbique.....	83
Tableau 4.	Pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanoliques des trois plantes et de l'acide Ascorbique.....	90
Tableau 5.	Composés attribués issus de l'analyse LC-UV-MS/MS des extraits de racines de <i>A. pyrethrum</i> L.....	126

Liste des figures

Figure 1.	Facteurs affectant la neurodégénérescence dans les troubles Neurologiques.....	4
Figure 2.	Vue schématique du clivage protéolytique de l'APP (protéine précurseur de l'amyloïde)	5
Figure 3.	Mécanisme de mort cellulaire programmée	6
Figure 4.	Système de dégradation des protéines : ubiquitine-protéasome	7
Figure 5.	Photos de <i>Anacyclus pyrethrum</i> L.....	9
Figure 6.	Structures des alkaloides isolés de <i>A. pyrethrum</i> L.....	13
Figure 7.	<i>Artemisia absinthium</i> L.	14
Figure 8.	Structures de quelques constituants de <i>A. absinthium</i> L.....	14
Figure 9.	<i>Urtica urens</i> L.....	17
Figure 10.	Composés isolés des parties aériennes de <i>Urtica urens</i> L.	19
Figure 11.	ROS cellulaires constitués d'espèces oxygénées radicalaires et non radicalaires	21
Figure 12.	Susceptibilité des neurones au stress oxydatif	23
Figure 13.	Stress oxydatif au niveau des biomolécules	24
Figure 14.	Stress oxydatif induit par les peptides β Amyloïdes dans une cellule du cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer. 4-HNE = 4-hydroxynonéal ; 8-oxo-dG = 8-oxo-déshydroguanine	26
Figure 15.	Antioxydants fréquemment rencontrés	28
Figure 16.	Structure des principales sous-classes de flavonoïdes	29
Figure 17.	Mécanisme de chélation des métaux de transition par la Quercétine.....	30
Figure 18.	Structure chimique des polyphénols à usage thérapeutique dans les maladies neurologiques liées à l'âge.....	35
Figure 19.	Neuroprotection des polyphénols contre les maladies neurodégénératives	36
Figure 20.	Représentation schématique des effets possibles du vieillissement sur les performances cognitives et des effets connus des polyphénols sur l'amélioration des diminutions cognitives	40
Figure 21.	Principaux effets des composés flavonoïdes sur la physiologie et la physiopathologie cérébrale pouvant éventuellement contribuer à l'amélioration cognitive	41
Figure 22.	Voies moléculaires de la survie neuronale sur lesquelles les composés flavonoïdes semblent agir et induire leurs effets dans le cerveau	43
Figure 23.	Structures chimiques de la galanthamine	45
Figure 24.	Différents Mécanismes d'action des alcaloïdes contre la maladie d'Alzheimer	46
Figure 25.	Boîte à outils du signal calcique neuronal	48
Figure 26.	Maintenance et utilisation des gradients de Ca^{2+} pour la signalisation.....	48
Figure 27.	Assemblage et sous-types des sous-unités des principaux canaux calciques neuronaux	50
Figure 28.	Mécanismes d'homéostasie calcique.....	53

Figure 29.	Rôle du signal calcique dans la plasticité synaptique.....	56
Figure 30.	Signal calcique dans un cerveau sain et un cerveau âgé ou en condition pathologique	59
Figure 31.	Oxydation de Cys97 active le Ca ²⁺ uniporteur mitochondrial.....	61
Figure 32.	Trois protéines liées à la maladie de Parkinson (α -synucléine, la parkine et la DJ-1) contrôlant l'absorption du Ca ²⁺ mitochondrial par la modulation des sites de contact RE - mitochondries	62
Figure 33.	Cellules CAD indifférenciées dans un milieu contenant du sérum. Image de contraste de phase	68
Figure 34.	Cellules CAD différenciées dans un milieu sans sérum montrant de longs axones. Image de contraste de phase	68
Figure 35.	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	164
Figure 36.	Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	164
Figure 37.	Activité de piégeage du radical DPPH par l'acide ascorbique.....	81
Figure 38.	Activité de piégeage de l'extrait aqueux de <i>Anacyclus pyrethrum</i> sur le radical DPPH.....	81
Figure 39.	Activité de piégeage de l'extrait méthanolique de <i>Anacyclus pyrethrum</i> L. sur le radical DPPH.....	82
Figure 40.	Activité de piégeage du radical DPPH par l'extrait aqueux de <i>Artemisia absinthium</i> L.....	82
Figure 41.	Activité de piégeage du radical DPPH par l'extrait méthanolique de <i>Artemisia absinthium</i> L.....	82
Figure 42.	Activité de piégeage du radical DPPH par l'extrait aqueux de <i>Urtica urens</i> L.....	83
Figure 43.	Activité de piégeage du radical DPPH par l'extrait méthanolique de <i>Urtica urens</i> L.....	83
Figure 44.	Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique.....	88
Figure 45.	Pouvoir réducteur de l'extrait aqueux de <i>Anacyclus pyrethrum</i> L.....	88
Figure 46.	Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique de <i>Anacyclus pyrethrum</i> L.....	89
Figure 47.	Pouvoir réducteur de l'extrait aqueux de <i>Artemisia absinthium</i> L.....	89
Figure 48.	Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique de <i>Artemisia absinthium</i> L.....	89
Figure 49.	Pouvoir réducteur de l'extrait aqueux de <i>Urtica urens</i> L.....	90
Figure 50.	Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique de <i>Urtica urens</i> L.....	90
Figure 51.	Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait aqueux de <i>A. pyrethrum</i> L. pendant 24 heures.....	93
Figure 52.	Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait méthanolique de <i>A. pyrethrum</i> L. pendant 24 heures.....	93
Figure 53.	Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait aqueux de <i>A. absinthium</i> L. pendant 24 heures.....	94
Figure 54.	Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait méthanolique de <i>A. absinthium</i> L. pendant 24 heures.....	94
Figure 55.	Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait aqueux de <i>U. urens</i> L. pendant 24 heures.....	95
Figure 56.	Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait méthanolique de <i>U. urens</i> L. pendant 24 heures.....	95
Figure 57.	Protection partielle des cultures de cellules CAD par l'extrait aqueux de <i>A. pyrethrum</i> L. (0.1 mg/ml) après 2 heures	99
Figure 58.	Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait méthanolique de	

	<i>A. pyrethrum</i> L. (0.1 et 0.01 mg/ml) après 2 heures	99
Figure 59.	Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait aqueux de	
	<i>A. absinthium</i> L. (0.1 et 0.01 mg/ml) après 2 heures	100
Figure 60.	Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait méthanolique	
	de <i>A. absinthium</i> L. (0.1 et 0.01 mg/ml) après 2 heures	100
Figure 61.	Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait aqueux de <i>U. urens</i> L.	
	(0.1 et 1 mg/ml) après 2 heures	101
Figure 62.	Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait méthanolique de	
	<i>U. urens</i> L. (0.1 et 1 mg/ml) après 2 heures	101
Figure 63.	Extrait aqueux de <i>A. pyrethrum</i> L. Le moment de l'injection de l'extrait est	
	la trente deuxième seconde (32s).	111
Figure 64.	Extrait méthanolique de <i>A. pyrethrum</i> L. Le moment de l'injection de	
	l'extrait est la cinquante deuxième seconde (52s).	112
Figure 65.	Dépolarisation des cellules CAD control.	112
Figure 66.	Dépolarisation en présence de l'extrait aqueux de <i>A. pyrethrum</i> L.	113
Figure 67.	Dépolarisation en présence de l'extrait méthanolique de <i>A. pyrethrum</i> L.	113
Figure 68.	Extrait aqueux de <i>A. absinthium</i> L. Le moment de l'injection de l'extrait	
	est la cinquante troisième secondes (53s).	114
Figure 69.	Extrait méthanolique de <i>A. absinthium</i> L. Le moment de l'injection de	
	l'extrait est la cinquante et unième seconde (51s).	115
Figure 70.	Dépolarisation du control.	115
Figure 71.	Dépolarisation en présence de l'extrait aqueux de <i>A. absinthium</i> L.	116
Figure 72.	Dépolarisation en présence de l'extrait méthanolique de <i>A. absinthium</i> L.	116
Figure 73.	Extrait aqueux de <i>U. urens</i> L. Le moment de l'injection de l'extrait est	
	la trente troisième seconde (33s).	117
Figure 74.	Extrait méthanolique de <i>U. urens</i> L. Le moment de l'injection de l'extrait	
	est la cinquantième secondes (50s).	118
Figure 75.	Dépolarisation du control.	118
Figure 76.	Dépolarisation en présence de l'extrait aqueux de <i>U. urens</i> L.	119
Figure 77.	Dépolarisation en présence de l'extrait méthanolique de <i>U. urens</i> L.	119

A vertical line on the left side of the page, a horizontal line across the top, and a vertical gray bar on the left side, all intersecting at the top-left corner.

Introduction

Introduction générale

La pollution de l'environnement, les xénobiotiques, le tabac et le stress sont autant de facteurs qui induisent la production des radicaux libres, nuisibles aux biomolécules et structures membranaires, impliquées dans une multitude de pathologies telles que les maladies neuro-dégénératives.

Ces maladies sont des affections très souvent invalidantes, et pour la plupart, dépourvues de traitement curatif, même si des traitements médicamenteux et non médicamenteux existent pour agir sur les symptômes et la qualité de vie. Les traitements symptomatiques spécifiques présentent par ailleurs des effets secondaires importants.

Dans le souci constant de contrer les maladies, les populations pauvres ont toujours cherché dans leur biotope des substances brutes ou transformées pour leurs besoins. Ces dernières années, l'exploitation et la culture des plantes aromatiques et médicinales sont en croissance constante dans les pays développés et ceux en voie de développement. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), plus de 80 % de la population mondiale dépend de la médecine traditionnelle pour leurs besoins en soins de santé primaires (**Subasri et John, 2016**). Ainsi, les plantes constituent une véritable alternative en matière de soins. L'exploitation des plantes utilisées en médecine traditionnelle est recherchée pour identifier les substances ayant des propriétés efficaces pour une utilisation plus rationnelle.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche des antioxydants et neuroprotecteurs naturels, en évaluant les propriétés antioxydantes et neuroprotectrices de trois plantes médicinales d'origine Algérienne (*Anacyclus pyrethrum* L., *Artemisia absinthium* L. et *Urtica urens* L.).

Dans la première partie et dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous avons commencé par une étude bibliographique, en définissant les maladies neurodégénératives et leurs principales causes et en rappelant la description, la systématique, la chimie, les utilisations médicinales des trois espèces végétales. Le deuxième chapitre portera sur l'oxydation, le stress oxydatif au niveau neurologique, les principaux antioxydants végétaux et leurs modes d'action. La seconde partie de ce deuxième chapitre est consacrée à la définition de la neurotoxicité, de la neuroprotection tout en citant le rôle de quelques plantes et substances phytochimiques. Le

troisième et le dernier chapitre est focalisé sur l'ion calcium, l'homéostasie calcique, le rôle du signal calcique à l'échelle neurologique et la relation entre la dys-homéostasie calcique et la neurodégénérescence.

Dans la deuxième partie désignée comme un quatrième chapitre qui correspond à l'étape expérimentale structurée en quatre volets; le premier axe porte sur l'extraction et la détermination des teneurs en composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes). Dans le deuxième axe, nous nous sommes intéressés à évaluer le pouvoir antioxydant des extraits des plantes par deux techniques chimiques (piégeage du radical DPPH, réduction de fer). Le troisième axe est consacré à l'étude de l'effet neurotoxique et neuroprotecteur des six différents extraits sur des cellules catecholaminergiques de souris (CAD). Le dernier axe portera sur l'effet des différents extraits végétaux sur le signal calcique au niveau des cellules CAD. Enfin une caractérisation biochimique par une méthode chromatographique est effectuée sur les extraits aqueux et méthanoliques de *A. pyrethrum* L.

Enfin, dans le cinquième chapitre, nous avons rapporté et discuté les résultats obtenus, entre autre les teneurs des composés phénoliques, l'étude de l'activité antioxydante des extraits des différentes plantes, l'étude de la neurotoxicité et de la neuroprotection des extraits sur les cellules catecholaminergiques de souris et l'impact de ces extraits sur le signal calcique sur ces cellules.

Notre travail sera en fin de compte couronné par une conclusion générale.

A vertical grey bar is positioned on the left side of the page, starting from the top horizontal line and extending to the bottom. A thin black horizontal line spans the width of the page, intersecting the vertical bar.

Partie

Bibliographique

Chapitre 1

Maladies neurodégénératives et plantes médicinales

1.1. Maladies neurodégénératives (MND)

Une maladie neurodégénérative est définie comme une détérioration, souvent irréversible, des facultés intellectuelles et cognitives, elle est généralement associée au vieillissement (**Iriti et al., 2010**). La cognition fait référence aux processus mentaux liés à l'obtention et à l'utilisation des informations afin de guider les comportements tels que l'apprentissage, la mémoire, l'attention, le langage, la motricité, la perception et la fonction exécutive (**Bakoyiannis et al., 2015**).

Des troubles cognitifs ont été décrits dans divers troubles neurologiques et neuropsychiatriques, notamment la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et autres types de démence, la schizophrénie, le trouble bipolaire et la dépression (**Froestl et al., 2013 ; Burg, 2017**). Au sens strict, une maladie neurodégénérative est une condition pathologique affectant les neurones en les condamnant à une mort certaine (**Burg, 2017**). Selon Sowndhararajan *et al.* (**2018**) les dommages causés aux cellules neuronales constituent le facteur le plus important de nombreux troubles neurodégénératifs. Les symptômes typiques de ces maladies sont l'anxiété, la dépression, le dysfonctionnement moteur, la perte de mémoire et la détérioration cognitive (**Sowndhararajan et al., 2018**). Lorsque ces symptômes apparaissent, il serait trop tard pour prendre des mesures pour prévenir ou retarder l'apparition de la maladie.

Les maladies neurodégénératives touchent un nombre important de personnes dans toutes les tranches d'âge. Elles affectent approximativement 30 millions d'individus à travers le monde (**Sheikh et al., 2013**). En plus de la réduction de l'espérance et de la qualité de vie des malades, les maladies neurodégénératives entraînent des charges financières importantes pour les membres de la famille et les systèmes de santé. Le coût des soins est égale ou supérieurs au coût des soins pour des maladies cardiaques ou du cancer (**Hurd et al., 2013**). Une estimation du coût des soins, aux États-Unis, pour les patients atteints de la maladie d'Alzheimer variait entre 159 et 215 milliards de dollars par an (**Ankri et Van Broeckhoven, 2013**).

1.2. Causes des maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives sont des pathologies multifactorielles induites par des facteurs endogènes et exogènes (fig. 1).

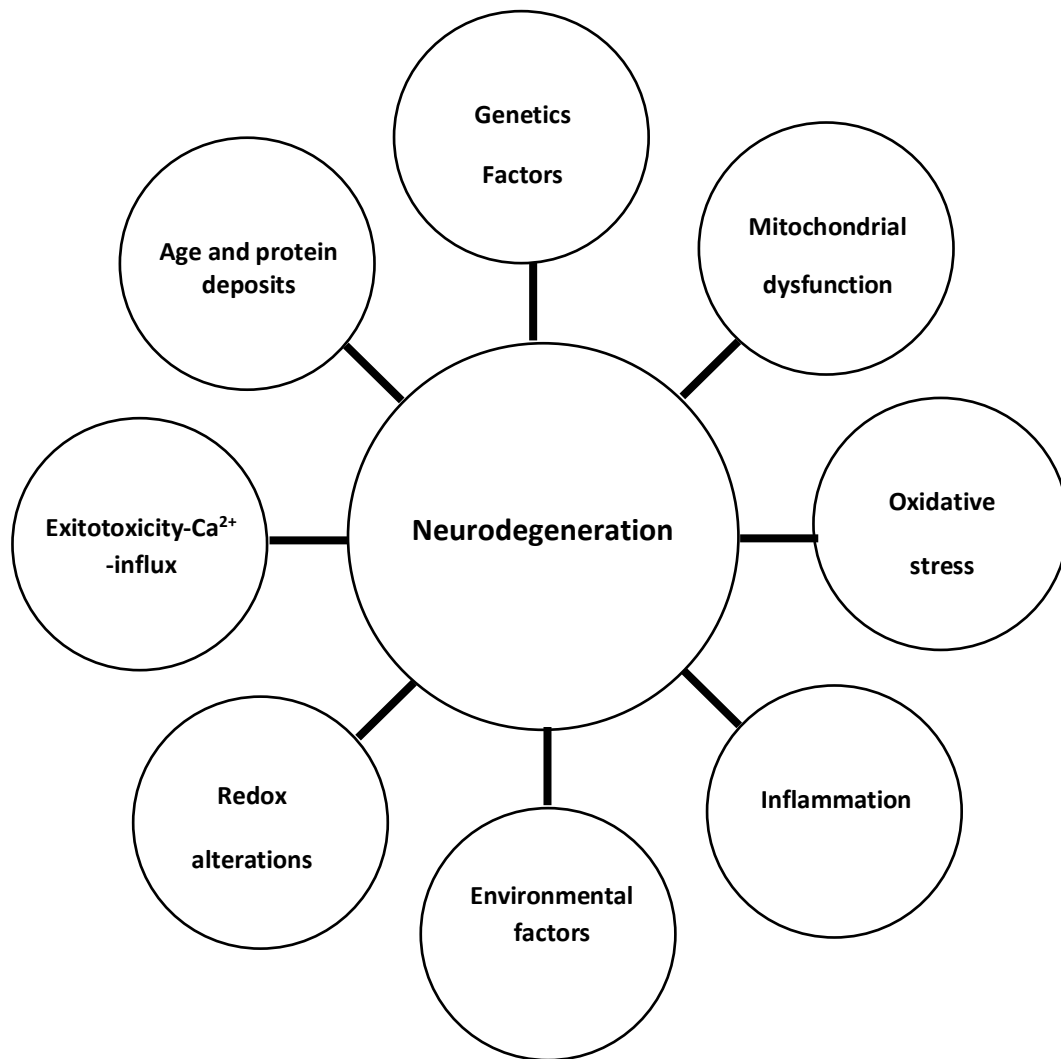


Figure 1. Facteurs affectant la neurodégénérescence dans les troubles neurologiques (Farooqui, 2010).

1.2.1. Génétique

Certains gènes responsables de maladies neurodégénératives spécifiques ont été découverts. Des mutations de plusieurs gènes notamment le PSEN1 et le PSEN2 codant pour les protéines précurseurs des amyloïdes (APP), la préséniline 1 et la préséniline 2, surviennent au début de la maladie d'Alzheimer et entraînent une altération de la production et une agrégation accrue de la protéine β -amyloïde (Nasica-Labouze *et al.*, 2015). PARK 1 (du mot parkinson) était le premier gène identifié dans la maladie de Parkinson. Il altère la production de la protéine α -synucleine (Hardiman et Doherty, 2011).

1.2.2. Agrégation de protéines toxiques (tau, A β , α -synucleine, huntingtine)

Après leur synthèse, les protéines acquièrent une forme native spécifique en trois dimensions qui leur permet d'exercer leurs actions biologiques. Il arrive que sous certaines contraintes, des protéines présentent une forme anormale à cause d'un mauvais repliement.

Dans des conditions physiologiques, ces protéines mal repliées, sont soit corrigées par des protéines chaperonnes soit dégradées et éliminées par le système ubiquitine-protéasome ou par le système phagosome-lysosome (autophagie). Des facteurs tels que l'âge, les mutations génétiques, des changements de l'environnement intracellulaire, les variations de pH, le stress oxydant, ou les métaux lourds, peuvent conduire à l'augmentation de concentration de protéines mal repliées très toxiques. Ces protéines normalement solubles vont alors s'agréger entre elles pour constituer des oligomères qui vont eux-mêmes s'agréger formant ainsi des fibrilles qui sont insolubles. Ces dernières vont alors former des inclusions intranucléaires ou intracytoplasmiques et peuvent également constituer des agrégats extracellulaires qu'on appelle alors plaques séniles (fig. 2) (Sweeney *et al.*, 2017 ; Cheignon *et al.*, 2018).

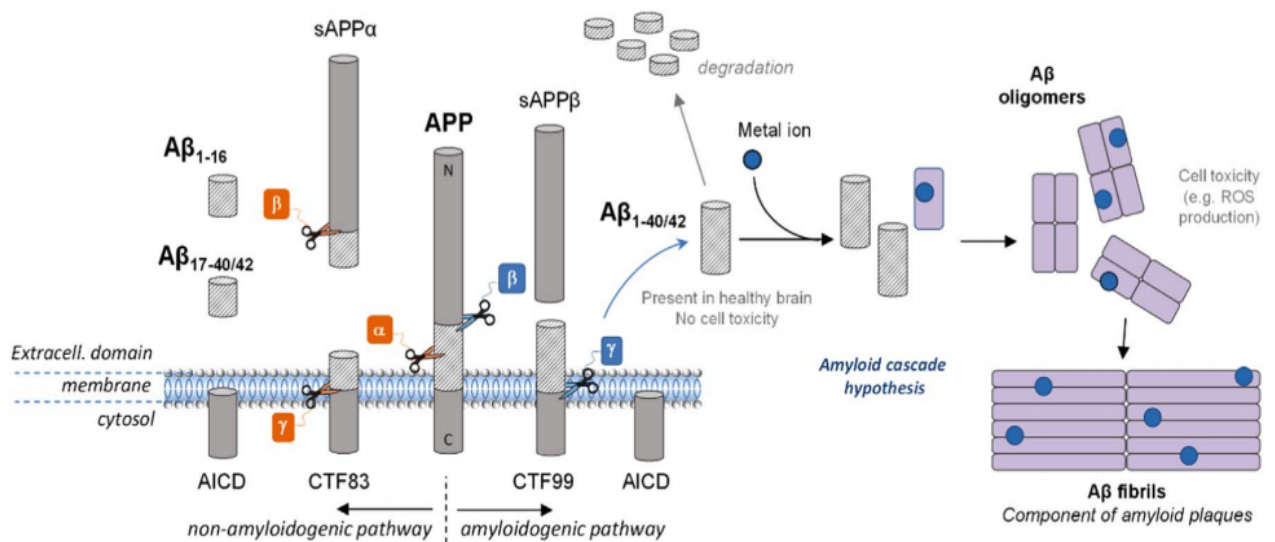


Figure 2. Vue schématique du clivage protéolytique de l'APP (protéine précurseur de l'amyloïde) (Cheignon *et al.*, 2018).

Dans la voie non amyloïdogénique, la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) est d'abord clivée par l' α -sécrétase, puis par la γ -sécrétase, pour former des peptides tronqués $A\beta_{17-40/42}$ ou par la β -sécrétase conduisant à la formation des $A\beta_{1-16}$ (fig. 2). Dans la voie amyloïdogénique, l'APP est clivée consécutivement par les β - et les γ -sécrétases, ce qui conduit à la formation de peptides $A\beta_{1-40/42}$. Selon l'hypothèse de cascade amyloïde, le peptide $A\beta_{1-40/42}$ serait en outre capable d'interagir avec les ions métalliques présents dans le cerveau et de former des oligomères puis des fibrilles, trouvées sous forme de plaques séniles *in vivo* (Cheignon *et al.*, 2018).

1.2.3. Augmentation de l'apoptose

L'apoptose est la mort cellulaire programmée (fig. 3). Il s'agit d'un processus biologique déclenché par des signaux spécifiques qui conduisent à l'autodestruction de la cellule. C'est un mécanisme génétiquement programmé et qui intervient dans des conditions physiologiques normales pour limiter la prolifération cellulaire, notamment lors du développement de l'organisme où les cellules sont souvent produites en surnombre (Nieoullon, 2011). Ainsi, le corps peut spécifiquement détruire des cellules inutiles ou incompétentes à un moment et un endroit précis. C'est notamment un moyen de prévention des cancers. Il semblerait que dans les MND, les agrégats extracellulaires pourraient servir de signal pour déclencher l'apoptose des neurones (Mattson, 2000).

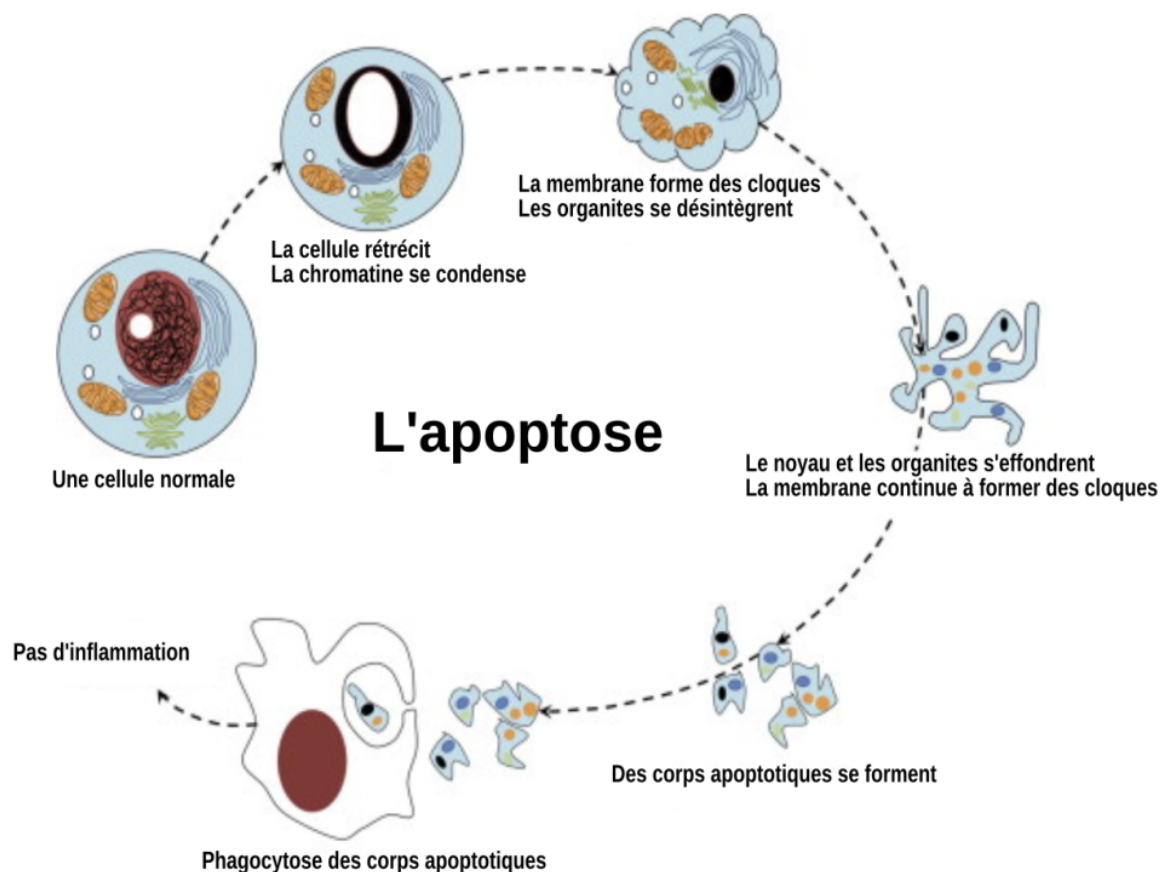


Figure 3. Mécanisme de mort cellulaire programmée (Abou-Ghali et Stiban, 2015).

1.2.4. Augmentation du stress oxydant (voir chapitre 2)

Le stress oxydatif résulte de niveaux excessifs de ROS générés par le déséquilibre des processus biochimiques normaux. Ces radicaux oxygène vont par la suite endommager tous les types de macromolécules, perturber les fonctions cellulaires normales et, en fin de compte, provoquer la mort cellulaire (**Abuhamadah, 2014**).

1.2.5. Dysfonctionnement du système ubiquitine-protéasome.

Une des voies de dégradation des protéines dans une cellule est le système ubiquitine-protéasome. Les protéines qui doivent être dégradées sont marquées par une protéine, l'ubiquitine, qui permet de les diriger vers le protéasome. Ce dernier est un complexe enzymatique qui va permettre de couper les protéines en peptides de 7 à 9 acides aminés qui seront ensuite hydrolysés puis recyclés hors du protéasome (fig. 4) (**Forman *et al.*, 2004**). L'ubiquitine a été retrouvée sur des protéines présentes dans des agrégats dans certaines MND, une preuve du dysfonctionnement du protéasome qui n'arrive plus à dégrader correctement les protéines marquées à l'ubiquitine (**Kumar *et al.*, 2016**).

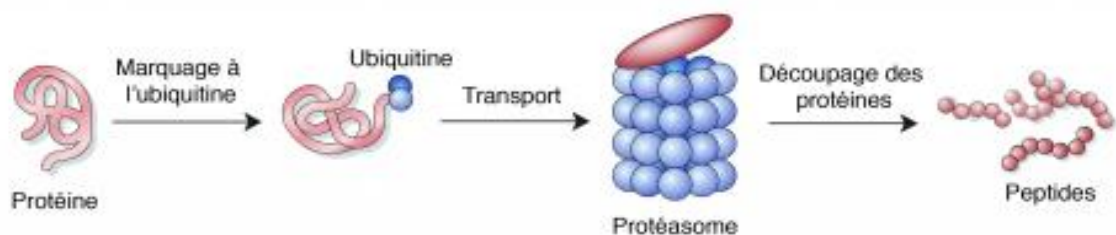


Figure 4. Système de dégradation des protéines : ubiquitine-protéasome (**Forman *et al.*, 2004**).

1.2.6. Inflammation

La neuroinflammation est un facteur largement associé à la pathogenèse de la MA (**Heneka *et al.*, 2010**). L'activation microgliale peut contribuer à la mort neuronale pendant les dommages au niveau du cerveau en libérant des molécules neurotoxiques pro-inflammatoires, les cyclooxygénases, en particulier la cyclooxygénase-1 (COX1), une enzyme impliquée dans la production de molécules pro-inflammatoires connues sous le nom de cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α). Ces molécules connues pour leurs effets délétères dans le cas d'une réponse exacerbée ou inadaptée. Le processus inflammatoire est ainsi directement mis en cause dans l'aggravation des lésions cérébrales aiguës secondaires (**Degos *et al.*, 2009 ; Bastianetto *et al.*, 2015**).

1.2.7. Excitotoxicité

Le Glutamate est le neurotransmetteur excitateur majeur du CNS, sa transmission se fait à travers trois récepteurs ionotropiques : le N-méthyl-D-aspartate (NMDAR), l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique (AMPA) et le kainate et un ensemble de récepteurs metabotropiques. L'hypothèse de l'excitotoxicité du glutamate postule qu'un excès de glutamate synaptique provoque une sur-activation des récepteurs post-synaptiques NMDA et AMPA entraînant la mort neuronale. Des niveaux élevés de glutamate, en activant en permanence ces récepteurs post-synaptiques, peuvent conduire à une augmentation de l'activité des enzymes cataboliques, le taux de calcium intracellulaire, la dépolarisation de la membrane mitochondriale, l'activation du système caspase et la production des ROS qui peuvent tous aboutir à la mort cellulaire (**Abuhamadah, 2014**).

1.2.8. Dysfonctionnement mitochondrial

Des petits agrégats et des amyloïdes oligomères rendent la membrane plasmique cellulaire et mitochondriale perméable. Elles sont donc responsables de la dérégulation calcique, la dépolarisation membranaire et la perte des fonctions mitochondriales. Le dysfonctionnement mitochondrial et le stress oxydatif jouent un rôle important dans le développement des MND (**Sheikh et al., 2013**).

1.2.9. Facteurs environnementaux

Bien qu'ils soient essentiels dans plusieurs réactions biologiques, Les métaux ont un rôle important dans la neurodégénérescence. De l'altération de leur homéostasie en résulte une surproduction de radicaux libres catalysés par le fer, le cuivre et d'autres métaux (**Sheikh et al., 2013**). Aussi, plusieurs études avaient démontré une corrélation positive entre l'exposition aux pesticides et les maladies neurodégénératives (**Baldi et al., 2003**).

1.3. Plantes médicinales ciblées

1.3.1. Introduction

Les plantes médicinales sont des éléments indispensables dans la médecine traditionnelle pratiquée partout dans le monde en raison de leur facilité d'accès et de leur faible coût. Environ 35 000 espèces de plantes sont employées dans le monde à des fins médicinales (Hans, 2007). La recherche menée sur des produits naturels a été une stratégie efficace pour découvrir de nouveaux produits pharmaceutiques. A travers le globe terrestre, des médicaments traditionnels à base de plante avaient été utilisés pour soulager et guérir des maladies liées à des problèmes du système nerveux, comprenant notamment *Calotropis procera*, *Satureja thymbra*, *Coridothymus capitatus*, *Thunbergia laurifolia*, *Annona réticulé*, *Annona squamosa*, *Plumeria rubra*, *Crateva magna*, *Crateva religiosa*, *Argyreia osyrensis*, *Suregada multiflora*, *Cassytha filiformis*, *Oxyceros horrid*, *Citrus aurantifolia*, *Citrus medica*, *Cissus hastate*, *Cissus repens*, *Aloe vera*, *Ricinus communis*, , *Aerva persica*, , *Hyocyamus niger*, *Cymbidium aloifolium*, *Gardenia ternifolia*, *Mikania hirsutissima*, *Glycosmis arborea*, *Phyllanthus reiculatus*, *Datura metel*, *Tamarindus indica*, *Alocasia macrorrhizos*, *Murraya koenigii*, *Lygodium flexuosum* et *Cassia occidentalis* (Anonyme 1).

1.3.2. *Anacyclus pyrethrum* L.

1.3.2.1. Généralités

Le pyrèthre d'Afrique ou camomille pyrèthre, *Anacyclus pyrethrum* L. (fig. 5) est une espèce herbacée endémique algérienne (Hmammouchi, 1999). Elle a été cultivée à l'échelle expérimentale dans les régions Himalayennes par des graines importées d'Algérie (Auhman, 1995). Elle a été également exportée d'Algérie vers l'Inde (Usmani *et al.*, 2016). Le genre *Anacyclus* comprend environ 13 espèces annuelles et pérennes, principalement concentrées en Afrique du nord-ouest mais également présentes dans d'autres pays méditerranéens (Harald, 1978).

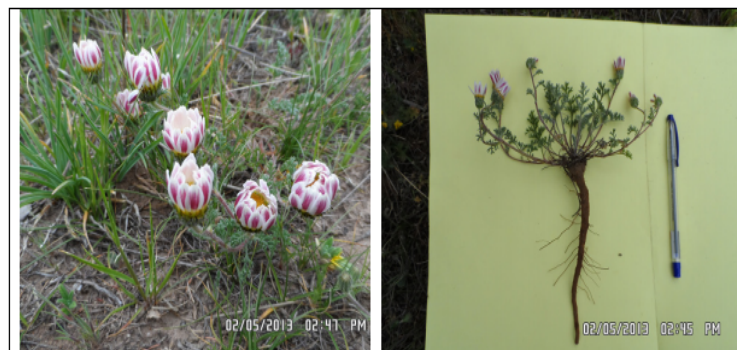


Figure 5. Photos de *Anacyclus pyrethrum* L. (Daoudi *et al.*, 2017).

1.3.2.2. Dénominations vernaculaires

Arabe / Amazigh : Aerq chleuh, Aqarqarha, Uud el attas, Oud es chlouh, Tigentest, Igentest (Abu-Rabia, 2012), Akkar Karha, Agargarha (**Elazzouzi et al., 2014**).

Anglais : Spanish pyrethrum root, Pellitory (**Usmani et al., 2016**).

Français : Pyrèthre d'Afrique (**Azzi et al., 2012**).

1.3.2.3. Situation botanique de l'espèce *Anacyclus pyrethrum* L.

Usmani *et al.* (2016) rapportent la classification de l'espèce comme suit :

Règne : Plantae

Division : Spermatophyta

Subdivision : Angiosperms

Classe : Dicotyledons

Sub classe : Metachlamydae

Ordre : Campanulatae

Famille : Compositae or Asteraceae

Genre : *Anacyclus*

Espèce : *Anacyclus Pyrethrum* L.

1.3.2.4. Utilisation médicinale

Anacyclus pyrethrum L. est largement utilisée en phytothérapie (**Hans, 2007**). En Algérie, on utilise depuis des siècles les racines de cette plante pour le traitement des infections respiratoires et le traitement des maladies hépatiques (**Bellakhdar, 1997**). Le pyrèthre possède des propriétés rajeunissantes et avait été considéré comme stimulant aphrodisiaque et sexuel chez les mâles (**Puri, 2003**). Elle stimule la sécrétion des hormones sexuelles LH, FSH et la testostérone chez les mâles (**Rad et al., 2014**). La racine de cette espèce peut potentiellement réduire la dose d'insuline chez les patients diabétiques, tout en diminuant la glycémie et le taux de cholestérol sérique (**Kushwaha et al., 2012**). De même, l'infusion des racines est recommandée en bain de bouche contre les maux des dents et en cas de problèmes liés à la sécrétion salivaire, elle est utilisée comme sialagogue (**Van Hecken et Practoner, 2004**). Elle possède une activité immunostimulante (**Bendjeddou et al., 2003**). Les alkylamides, présents dans le *A. pyrethrum* L., ont été décrits comme produisant une forte stimulation de la fonction phagocytaire (**Agnivesha et Charaka, 2011**). Des propriétés anti-inflammatoires (**Annalakshmi et al., 2012**), antibactériennes, insecticides (**Zaidi et al., 2013**), antipyrétiques (**Priya et al., 2014**) et antioxydantes (**Kalim et al., 2010**) ont été toutes reliées au pyrèthre.

Le système cholinergique central, la transmission sérotonergique et la noradrénaline jouent un rôle essentiel dans la fonction cognitive du cerveau. Le système cholinergique central est considéré comme le neurotransmetteur le plus important impliqué dans la régulation des fonctions cognitives (**Levander et al., 2009**). Les fonctions cognitives altérées sont les principaux caractères de maladie d'Alzheimer (**Iriti et al., 2010**). La perte de neurones cholinergiques dans le noyau Basalis magno cellulaire est une des caractéristiques les plus importantes de cette pathologie, principalement responsable de la perte de mémoire (**Patel et al., 2011**). Un traitement médicamenteux qui augmente la neurotransmission cholinergique, entraîne une amélioration des déficits cognitifs dans la maladie d'Alzheimer (**Pattewar et al., 2011**). L'Akarkarha (une appellation de *A. pyrethrum* L.) inhibe l'enzyme acétylcholinestérase augmentant ainsi la concentration de l'acétylcholine dans le cerveau et améliorant par conséquent la mémoire. Elle peut donc s'avérer utile contre l'Alzheimer (**Sujith et al., 2012**). L'effet neuro-pharmaceutique d'Akarkarha est probablement dû à l'implication des neurotransmetteurs puisque la mémoire est performante seulement quand les niveaux élevés de neurotransmetteurs sont atténués. Ronald et al. (2012) avaient constaté une nette amélioration de la mémoire chez des rats albinos Wistar traités avec trois différentes doses de pyrèthre (50, 100, 200 mg/kg). Akarkarha est considéré comme tonique du système nerveux (**Tyagi et al., 2011**). La drogue est un antidépresseur (**Badhe et al., 2010**), utilisé dans le traitement de la paralysie, de l'épilepsie (**Elazzouzi et al., 2014**) et de l'hémiplégie (**Kumar et Lalitha, 2012**). C'est un myorelaxant (**Gautam et al., 2011**). L'eugénol détecté dans le pyrèthre (**Usmani et al., 2016**) retardait l'apparition des crises épileptiques induite par le PTZ. La plante produit probablement un effet anticonvulsif, en améliorant la neurotransmission GABAergique (**Gautam et al., 2011**).

1.3.2.5. Composition chimique

Le criblage phytochimique des racines, des feuilles et des fleurs de pyrèthre avait révélé la présence d'alcaloïdes, de composés réducteurs et de tanins cathéciques, des tanins galliques, des triterpènes, des stérols, du mucilage, des coumarines, des saccharides et des holosides (**Elazzouzi et al., 2014**). L'étude des extraits éthanoliques de racine, de feuille et de tige de *A. pyrethrum* L. avait révélé la présence de stéroïdes, de triterpènes, de sucres réducteurs, de sucres, d'alcaloïdes, de flavonoïdes, de saponine, de tanins, d'antraquinones et d'acides aminés (**Subasri et John, 2016**).

Les teneurs en flavonoïdes, en phénol total et en polyphénols sont plus élevées dans les fleurs comparées aux feuilles et aux racines. Les racines sont riches en alcaloïdes tandis que les parties aériennes sont riches en tanins et en flavonoïdes. La racine contient une résine brune acide, de l'acide tannique, de l'inuline, de la gomme, de divers sels et de la lignine (**Cherrat *et al.*, 2017**) et des traces de métaux (Zn, Fe, Cu, Cd, Cr, Ni et Pb) (**Subasri et John, 2016**).

A. pyrethrum L. produit également des huiles essentielles avec une production maximale durant le mois de juin, en période de floraison (**Selles *et al.*, 2013 ; Usmani *et al.*, 2016**).

Les alcaloïdes les plus importants découverts dans les racines de pyrèthre sont des alkamides tels que la pellitorine, l'anacycline, le phényléthylamide (fig. 6) (**Althaus *et al.*, 2017**), la phényléthylamine et les amides polyacétyléniques I-IV (**Usmani *et al.*, 2016**).

Les alkamides représentent une classe de produits naturels avec une diversité structurelle considérable et un large spectre de bioactivités. La famille des Asteraceae est caractérisée par la production et l'accumulation des alkamides aliphatiques essentiellement (Rios, 2012). D'après Boonen *et al.* (2012), plus de 70 N-alkylamides ont été identifiés dans cette famille. En dépit de l'architecture moléculaire relativement simple des alkamides, ces produits naturels présentent une grande variabilité de structure et une gamme importante d'activités biologiques ; immuno-modulatrice, antimicrobienne, antivirale, larvicide, insecticide, diurétique, piquante, analgésique ainsi qu'antioxydante et cannabimimétique (**Greger, 2015**), et anti-inflammatoire (**Chicca *et al.*, 2009**). En outre, les alkamides sont impliqués dans la potentialisation des antibiotiques, l'inhibition de la biosynthèse de la prostaglandine, la synthèse d'ARN et le métabolisme de l'acide arachidonique (**Yolanda Rios, 2012**). Les N-alkylamides sont des substances lipophiles, exerçant des fonctions régulatrices de croissance similaires à celles des Nacylethanolamines (NAE) (**Blancaflor *et al.*, 2014**). Les alkylamides avaient montré une activité anti protozoaire selon Althaus *et al.* (2017). Les différents N alkylamides possèdent une grande diversité structurelle avec une liaison peptidique centrale comme caractéristique commune. En général, ces molécules sont constituées d'une chaîne aliphatique d'acides gras polyinsaturés liés à une amine à chaîne courte (**Veryser *et al.*, 2014**). Alkylamides, also known as alkamides, are a class of fatty acid-like molecules. Chaque alkylamide contient un groupe amide, une chaîne alkyle et un groupe fonctionnel tel qu'un groupe isobutyle, benzyle ou méthyle. Le nombre de carbones dans la chaîne alkyle peut varier, ainsi que le nombre et la position des doubles et triples liaisons (**Gulledge *et al.*, 2018**). Les structures alkylamides peuvent être davantage diversifiées avec des modifications incluant des hydroxylations et des méthylations (**Leyte-Lugo *et al.*, 2015**).

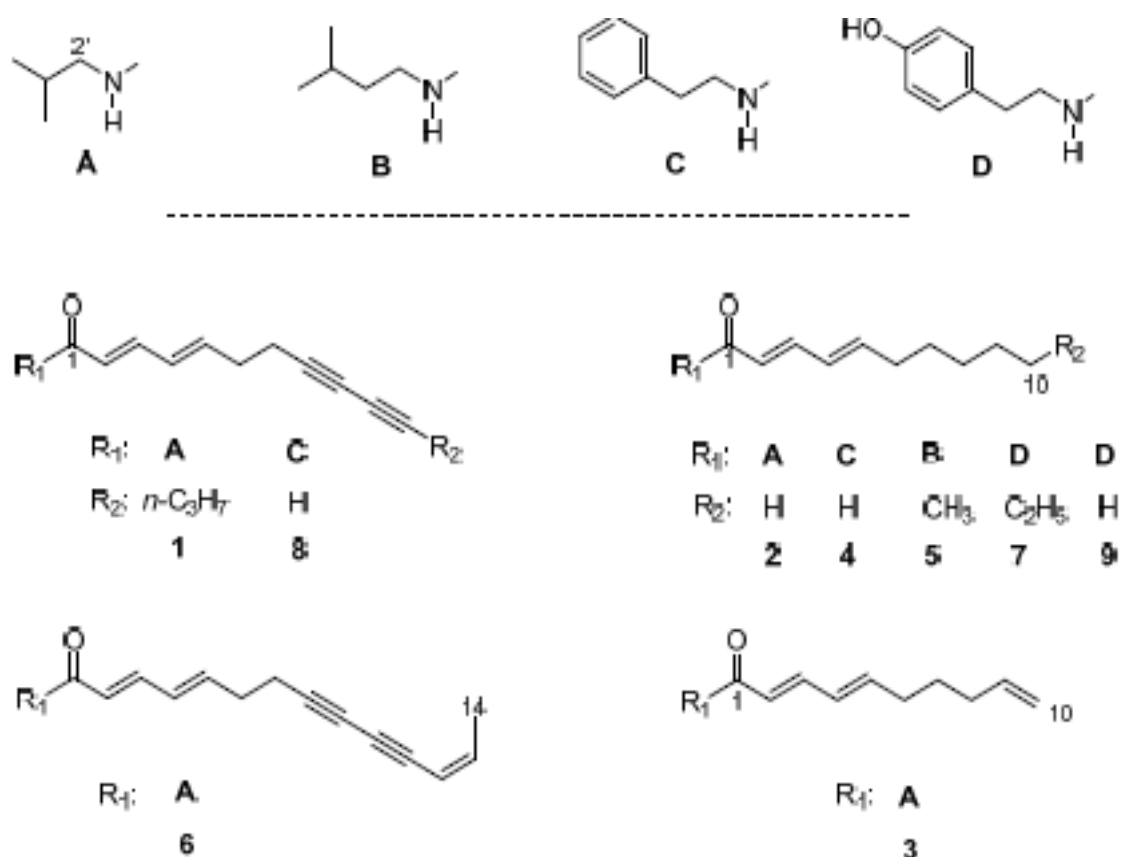


Figure 6. Structures des alkamides isolés de *A. pyrethrum* L. (Althaus *et al.*, 2017).

- Composé 1 : tetradeca-2E,4E-dien-8,10-diynoic acid isobutylamide (anacycline).
 Composé 2 : deca-2E,4E-dienoic acid isobutylamide (pellitorine).
 Composé 3 : deca-2E,4E,9-trienoic acid isobutylamide (9,10-dehydropellitorine).
 Composé 4 : deca-2E,4E-dienoic acid 2-phenylethylamide.
 Composé 5 : undeca-2E,4E-dien-8,10-diynoic acid isopentylamide.
 Composé 6 : tetradeca-2E,4E,12E-trien-8,10-diynoic acid isobutylamide.
 Composé 7 : dodeca-2E,4E-dien acid 4-hydroxy-2-phenylethylamide.
 Composé 8 : undeca-2E,4E-dien-8,10-diynoic acid 2-phenethylamide.
 Composé 9 : deca-2E,4E-dienoic acid 4-hydroxy-2-phenylethylamide.

1.3.3. *Artemisia absinthium* L.

1.3.3.1. Généralités

Le genre *Artemisia* comprend environ 500 espèces ubiquitaires. Parmi elles, l'absinthe (*Artemisia absinthium* L.) (fig. 7), également appelée herbe sainte, herbe des vierges, herbe aux vers, armoise amère ou encore absinthe officinale (LÊ *et al.*, 2007). L'herbe est originaire des pays méditerranéens chauds (Nezhadali *et al.*, 2010). L'absinthe est une épice aromatique, largement utilisée comme agent aromatisant ; il est utilisé dans les boissons non alcoolisées et

certaines aliments, en particulier la confiserie et les desserts (Canadanovic-Brunet *et al.*, 2005). La drogue contient au minimum 2 ml d'huile essentielle/kg (Wichtl et Anton, 2003). Le thujone (40-70%) (fig. 8), un cétone monoterpénique (Lachenmeier, 2010), est un agent neurotoxique dans l'huile d'absinthe, utilisée dans la préparation de boisson absinthe, maintenant interdite dans la plupart des pays (Canadanovic-Brunet *et al.*, 2005). D'ailleurs, l'utilisation chronique de l'absinthe produirait un syndrome appelé absinthisme, caractérisé par une dépendance, une hyperexcitabilité, des crises d'épilepsie et des hallucinations (Padosch *et al.*, 2006 ; Nathan-Maister, 2008). Des travaux avaient montré que des doses élevées de *Artemisia absinthium* L., consommée pendant une longue durée, provoquaient des aberrations chromosomiques (Alshibly, 2014).



Figure 7. *Artemisia absinthium* L. (Beigh et Ganai, 2017).

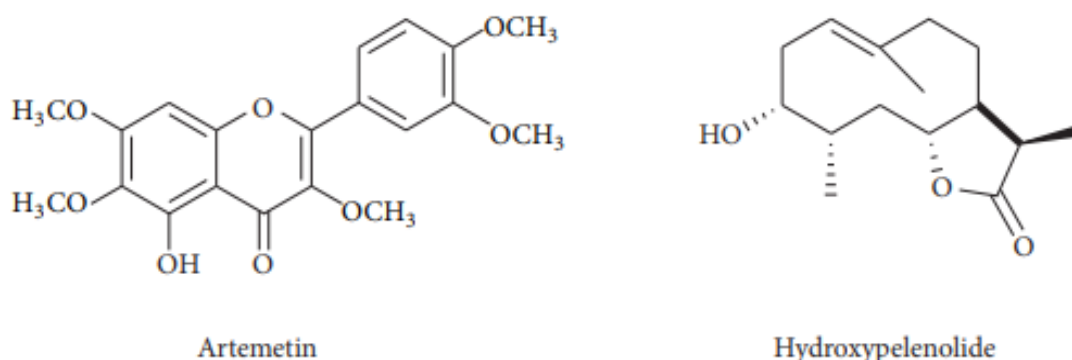


Figure 8. Structures de quelques constituants de *A. absinthium* L. (De Almeida *et al.*, 2016).

1.3.3.2. Dénominations vernaculaires

Arabe : chajret mariem (**Msaada et al., 2015**), Afsanteen, DamseeH (**Ahmad et al., 2010**).

Anglais : Absinth, wormwood, warmot, mugwort, absinth sagewort, common sagewort,

Français : absinthe, grande absinthe, herbe sainte, absinthe suisse, alvine, armoise amère (**Ghédira et Goetz, 2016**).

1.3.3.3. Situation botanique de l'espèce *Artemisia absinthium* L.

Ghédira et Goetz (**2016**) rapportent la classification de l'espèce comme suit :

Règne : Plantae (végétale)

Superdivision : Embryophyta

Division : Tracheophyta

Subdivision : Spermatophytina – (spermatophytes, phanérogames)

Classe : Magnoliopsida

Superordre : Asteranae

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae

Genre : *Artemisia*

Espèce : *Artemisia absinthium* L.

1.3.3.4. Utilisation médicinale

Elle a été traditionnellement utilisée comme balsamique, dépurative, diurétique, emménagogue et dans le traitement de la leucémie et de la sclérose (**Canadanovic-Brunet et al., 2005**). La partie aérienne de *A. absinthium* L. possède une forte activité anti-venin de serpent (Nalbantsoy *et al.*, 2013). Elle a été utilisée pour le traitement des maux d'estomac dans la médecine populaire turque (**Baytop, 1984**). L'extrait aqueux de *A. absinthium* L. aux doses de 50, 100 ou 200 mg/kg de poids corporel par jour a un effet protecteur contre les lésions hépatiques chez la souris pouvant être dû à ses effets antioxydants ou immuno-modulateurs (**Amat et al., 2010**). L'extrait méthanolique de *A. absinthium* L. stimule la croissance des neurites induites par le facteur de croissance des nerfs (**Li et al., 2004**). L'absinthe améliore la mémoire et restaure le déclin de la fonction mentale (**Yarnell et Abascal, 2013**). L'extrait de *A. absinthium* L. à 500 mg/kg prolonge le sommeil induit par le pentobarbital ($P < 0,05$) ainsi que la létalité induite par la strychnine (**Ghédira et Goetz, 2016**). *A. absinthium* L. a un effet anti-neuro-inflammatoire, la caruifoline D semble être le constituant majeur agissant dans

l'effet anti-inflammatoire, passant par la c-jun N-terminal kinase et la signalisation par la protéine kinase C/NF- κ B (**Zeng et al., 2015**). L'huile essentielle de *A. absinthium* L. présentait un effet neuroprotecteur après une ischémie cérébrale chez l'animal (Bora et Sharma, 2010). Elle pourra par conséquent jouer un rôle dans les maladies neurodégénératives (**Alshibl, 2014**). Le trans-caryophyllène, un des constituants de l'huile de *A. absinthium* L., a été signalé comme anti nociceptif (**Katsuyama et al., 2013**), anxiolytique et antidépresseur (**Bahi et al., 2014**).

1.3.3.5. Composition chimique

Les acides Phénoliques, l'acide tannique, gallique, hemihydrate chlorogénique, caffeique, vanillique, syringique, ferulique, p-coumarique, rosmarinique, et trans-cinnamique représentent la majeure fraction des polyphénols contenus dans les extraits méthanoïques des parties aériennes d'absinthe (**Msaada et al., 2015**). Ces parties contiennent aussi des flavonoïdes (**Msaada et al., 2015**), du thymol et du carvacrol ainsi que d'autres composés phénoliques (**Kordali, 2006**). L'analyse par chromatographie liquide (HPLC) menée par Zheng (**1994**) avait révélé la présence d'autres glycosides flavonoïdes telles que l'isoquercitrine, la quercétine-3-O-D-glucoside, la quercétine-3-O-rhamnoglucoside, l'isorhamnetine-3-O-rhamnoglucoside et l'isorhamnetine-3-glucoside (**Msaada et al., 2015**). Des lactones sesquiterpéniques, l'artémétine, l'absinthine et l'artabsine sont aussi omni présents dans la plante (**Kifleyohannes et al., 2014 ; De Almeida et al., 2016**).

1.3.4. *Urtica urens* L.

1.3.4.1. Généralités

Les orties *Urtica sp* de la famille des Urticacées sont des herbes annuelles ou pérennes. Le genre *Urtica* est représenté par plus d'une cinquantaine d'espèces (**Daoudi et al., 2015**). Les espèces les plus en vue sont la grande ortie *Urtica dioica* L. et la petite ortie *U. urens* L. qui sont, toutes les deux, originaire d'Europe, d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du Nord (**Jaradat et al., 2017 ; Kregiel et al., 2018**) (fig. 9). Les orties poussent partout dans le monde dans des climats doux à tempérés. Ils préfèrent les habitats ouverts ou partiellement ombragés avec beaucoup d'humidité et se retrouvent souvent dans les forêts, près des rivières ou des ruisseaux et au bord des routes (**Kregiel et al., 2018**).

1.3.4.2. Dénominations vernaculaires

Arabe : Hurrig, Hurriga (**Ghourri et al., 2014 ; Daoudi et al., 2015**).

Anglais : Nettle (**Maaroufi et al., 2017**), Small nettle (**Kregiel et al., 2018**), Burning nettle (**Lati et al., 2016**), Dwarf nettle (**Nencu et al., 2015**).

Français : Ortie brûlante, Petite ortie (**Daoudi et al., 2015**).

1.3.4.3. Situation botanique de l'espèce *Urtica urens* L.

Spichiger *et al.* (**2002**) rapportent la classification de l'espèce comme suit :

Règne : *Plantae*

Classe : *Eudicots*

Sous classe : *Rosidées*

Super ordre : *Eurosidées*

Ordre : *Rosales*

Famille : *Urticaceae*

Genre : *Urtica*

Espèce : *Urtica urens* L.



Figure 9. *Urtica urens* L. (**Jaradat et al., 2017**).

1.3.4.4. Utilisations médicinales

D'après les études ethnobotaniques, on relève que les espèces étudiées du genre *Urtica* ont le même nom vernaculaire «hurriga», d'où la difficulté de savoir les usages thérapeutiques de chacune des espèces (**Ghourri et al., 2014**). Les différentes parties des orties sont indiquées en thérapie traditionnelle ; leur utilisation locale y est surtout liée aux usages locaux contre l'anémie, le rhumatisme, l'eczéma, la rhinite allergique et rhumatoïde, et les racines, en particulier, sont utilisées pour le traitement de l'hyperplasie bénigne de la prostate (**Farag et al.,**

2013). Des recettes à base de *Urtica urens* L. et d'autres plantes sont prescrites contre la pyélonéphrite et contre la lithiase (**Farag et al., 2013 ; Ghourri et al., 2014**). En Turquie, les populations utilisent l'ortie brûlante pour le traitement des maladies gastro-intestinales, le diabète et les problèmes rénaux (**Sargin et al., 2013**). De plus, l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *Urtica urens* L. possède une activité anti nociceptive et anti-inflammatoire significative (**Marrassini et al., 2010**) et anti cancer (**Al Doghaither et al., 2016**). L'espèce est connue depuis longtemps pour avoir des effets tranquillisants et anxiolytique chez le peuple marocain (**Doukkali et al., 2014**).

1.3.4.5. Composition chimique

Lorsque l'Ortie est en contact avec la peau, les extrémités bulbueuses des trichomes se détachent, laissant des tubes pointus en forme d'aiguilles. Ceux-ci peuvent percer la peau et injecter un fluide contenant des substances y compris l'acide formique, l'histamine, l'acétylcholine et la sérotonine. Une démangeaison douloureuse et une sensation de brûlure, pouvant durer jusqu'à 12 h, se produiraient suite à ce frôlement (**Kregiel et al., 2018**).

U. urens L. est une plante riche en composés polyphénolique, tanins, mono et tri-terpènes, vitamines, acides, polysaccharides, choline, xanthophylles, caroténoïdes, anthocyanines (**Maaroufi et al., 2017**), des alcaloïdes, des saponines et du phytate (**Marrassini et al., 2010**).

Les coumarines, les stérols, les acides phénoliques tels que l'acide phénolcarboxilique, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide ellagique et les flavonoïdes telles que la patulétine, la rutine, le kaempférol, la quercétine, l'isorhamnetine, le β -sitosterol, la scopoletine, le β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside, l'acide succinique, la kaempferitrine, la β -adenosine et le Tryptophane sont également présents dans cette plante (fig. 10) (**Nencu et al., 2015 ; El-Seadawy et al., 2018**).

Les feuilles de *U. urens* L. sont riches en minéraux comme le fer, le manganèse, le zinc, le cuivre, le calcium, le potassium, l'azote, le magnésium, le phosphore et le sodium (**Marrassini et al., 2010**). Les feuilles de cette plante ont un taux de protéines relativement élevé (66%) selon Mzid et al. (**2017**).

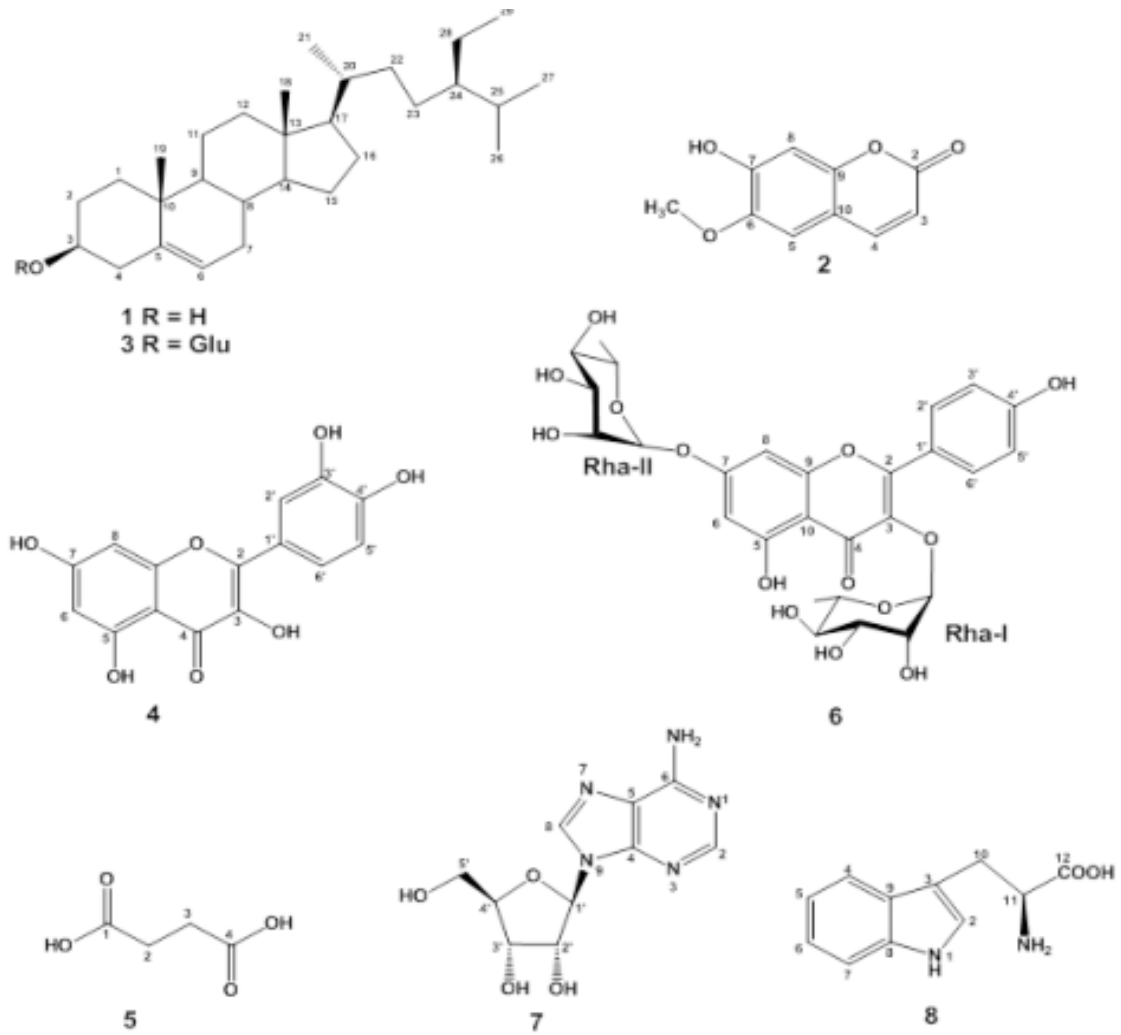


Figure10. Composés isolés des parties aériennes de *Urtica urens L.* (El-Seadawy *et al.*, 2018).

1. β - sitosterol, 2. Scopoletine, 3. β - sitosterol-3-O- β -D-glucoside, 4. Quercetine, 5. Acide succinique, 6. Kaempferitrine, 7. β -adenosine, 8. Tryptophane.

Chapitre 2

Oxydation,
neurodégénération et
plantes
neuroprotectrices.

2.1. Introduction

Les radicaux libres sont des molécules avec un ou plusieurs électrons non appariés dans leurs dernières orbitales qui en font des molécules instables à la recherche d'électrons des molécules voisines (**Picón-Pagès *et al.*, 2019**). La production physiologique des espèces réactives oxygénées (ROS) à très basse concentration régule l'activité mitochondriale, les facteurs de transcription, la régulation de la potentialisation à long terme (LTP) et même le tonus vasculaire par la NADPH oxydase (NOX) (**Li et Pagano, 2017**). Les ROS / RNS sont des messagers de signalisation importants pour la prolifération, la différenciation et d'autres événements critiques au cours du développement (**Ye *et al.*, 2015**). Ils peuvent également être produits lors de la régulation des fonctions cellulaires létales telles que la mort cellulaire programmée et la réponse immunitaire (**Valko *et al.*, 2006**).

Les cellules génèrent en permanence des oxydants et produisent des antioxydants (**Holmstrom et Finkel, 2014**). Malgré leurs tentatives pour atteindre un équilibre sain entre les deux, les organismes rencontrent de nombreuses situations dans lesquelles les niveaux d'oxydant ne sont plus synchroniser avec les systèmes de détoxification de la cellule, générant une condition potentiellement mortelle appelée stress oxydatif (**Reichmann *et al.*, 2018**).

2.2. Stress oxydatif au niveau cellulaire

Les ROS sont l'anion superoxyde O_2^- , le radical hydroxyl ($OH\cdot$), le radical alkoxy ($RO\cdot$), le radical peroxy ($ROO\cdot$), le radical hydro-peroxy ($HO\cdot$) et ceux capable de générer des espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les aldéhydes (HCOR), l'acide chlorhydrique (HCL), les peroxydes organiques (ROOH), l'oxygène singulet ($1O_2$), l'ozone (O_3) et l'oxyde d'azote (NO) (**Picón-Pagès *et al.*, 2019**).

Les ROS les plus pertinents physiologiquement sont les anions superoxydes (O_2^-) et les peroxydes d'hydrogène (H_2O_2). Ils sont constamment produits en tant que sous-produits de la respiration dans la chaîne de transport d'électrons mitochondriale (ETC) (Angelova et Abramov, 2018) et lors du repliement oxydatif des protéines dans le réticulum endoplasmique, ainsi que par des membres de la famille des NADPH oxydases (NOX) et du cytochrome p450 (**Holmstrom et Finkel, 2014 ; Hrycay et Bandiera, 2015 ; Ye *et al.*, 2015**) (fig. 11). L'anion superoxyde est facilement converti en peroxyde d'hydrogène par la superoxyde dismutase. Le peroxyde d'hydrogène est ensuite détoxifié par les catalases et les peroxydases (**Holmstrom et Finkel, 2014**) ou transformé en radicaux hydroxyles ($OH\cdot$) lors de la réaction avec des métaux de transition, en particulier les ions Fe^{2+} et Cu^{2+} (réaction de Fenton et d'Haber Weiss) (**Jomova**

et Valko, 2011). Les radicaux hydroxyles sont considérés comme l'un des ROS les plus réactifs, responsables de la plupart des dommages oxydatifs (Reichmann *et al.*, 2018).

Les organismes avaient développé une multitude de systèmes de défense antioxydants pour contrer la production des ROS et pour réparer les dommages oxydatifs. En plus des enzymes de détoxification des ROS tels que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion S-transférase (GST) et des antioxydants non enzymatiques tels que les vitamines C et E, les caroténoïdes et les flavonoïdes (Zhou *et al.*, 2014 ; Marengo *et al.*, 2016), les cellules utilisent divers systèmes de réparation comme la méthionine sulfoxyde réductase, la thioredoxine (Trx), la glutarédoxine (Grx), le glutathion (GSH) et le NADPH pour inverser les modifications oxydatives et restaurer l'homéostasie redox (Lu et Holmgren, 2014 ; Ye *et al.*, 2015 ; Nemmiche, 2017) (fig. 11).

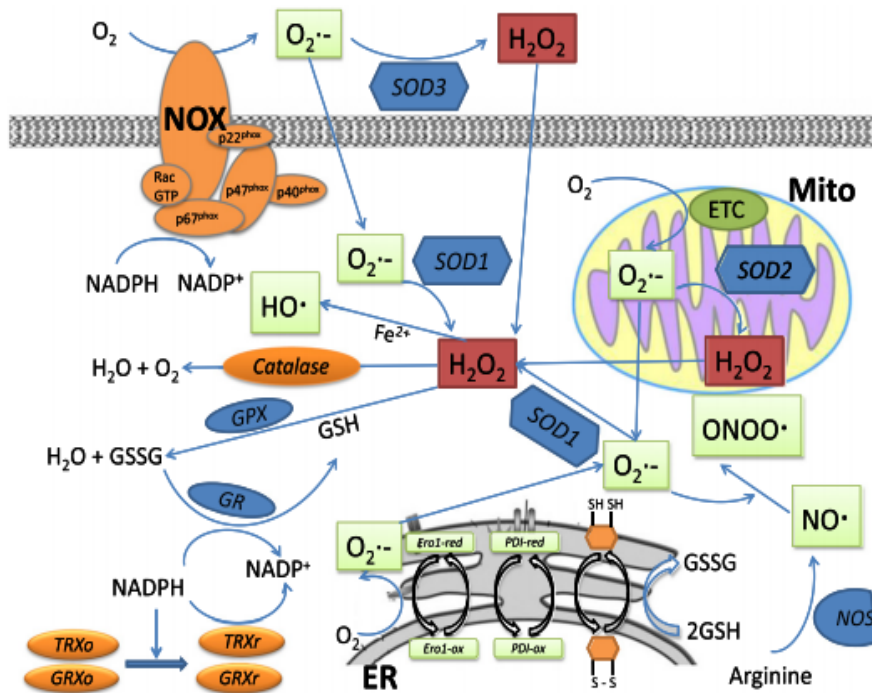


Figure 11. Les ROS cellulaires constitués d'espèces oxygénées radicalaires et non radicalaires (Ye *et al.*, 2015).

2.3. Stress oxydatif au niveau neurologique

L'accumulation des ROS est considérée depuis longtemps comme un facteur important du vieillissement et des maladies liées à l'âge (**Labunskyy et Gladyshev, 2013 ; Haq et Al Amro, 2019**). D'après Iriti *et al.* (**2010**), le stress oxydatif et la neuro-inflammation sont des facteurs clés dans l'étiopathogénie des maladies neurodégénératives et neurologiques. Il est impliqué dans plusieurs pathologies du système nerveux telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson et de Huntington (**Butterfield, 2014**).

Les ROS sont produites via la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, la plus grande source d' $O_2^{\cdot-}$ et d' H_2O_2 (**Angelova et Abramov, 2018**). L'efficacité de la chaîne de transport d'électrons diminue avec l'âge, ce qui signifie une production accrue de ces deux radicaux libres (**Eckmann et al., 2013**). Les conséquences physiopathologiques de ce phénomène sont la peroxydation lipidique dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, du corps de Lewy, et dans le liquide céphalorachidien des patients atteints de la maladie de Huntington et la sclérose en plaques (**Picón-Pagès et al., 2019**). En outre, des dommages oxydatifs des protéines, de l'ARN et de l'ADN sont présents dans le cerveau des patients atteints de maladies neurodégénératives (**Blasco et al., 2017**). Les autres sources pertinentes de ROS sont les NADPH oxydases (NOX), les peroxysomes, les oxydases neuronales telles que les monoaminoxidases (MAO), la xanthine oxydase, et les lipocyclooxygénase pro-inflammatoires. Toutes ces sources alternatives de ROS sont également impliquées dans les processus neurodégénératifs associés au vieillissement (**Picón-Pagès et al., 2019**). Ainsi, il a été rapporté que les NOX de la microglie et des astrocytes contribuent à la mort neuronale dans la maladie d'Alzheimer (**Chay et al., 2017**). Des résultats similaires ont été obtenus dans les neurones dopaminergiques contribuant à l'apparition de la maladie de Parkinson (**Zawada et al., 2015**) ou dans l'implication de cellules microgliales dans la progression de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (**Jaronen et al., 2013**).

Le rôle potentiel des espèces réactives azotées, en particulier le peroxy-nitrite, dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives est pertinent car ses précurseurs l'oxyde nitrique et l'anion superoxyde sont co-localisés dans le tissu cérébral (**Picón-Pagès et al., 2019**). Les taux de 3-nitrotyrosine, un biomarqueur pour les espèces réactives de l'azote, sont élevés dans les maladies neurodégénératives (**Smith et al., 1997**).

Le cerveau est l'un des principaux organes susceptibles aux effets néfastes du stress oxydatif par la génération excessive d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) (**Cobley et al., 2018**) (fig. 12). Il a une capacité limitée à détoxifier les ROS en raison de son faible pouvoir de

production de glutathion par les cellules neuronales, son taux métabolique élevé, son taux élevé en ions métalliques, la composition plus riche des neurones en acide gras polyinsaturés sensibles à l'oxydation et surtout de sa capacité limitée de régénération et de réparation par rapport à d'autres organes (**Gandhi et Abramov, 2012 ; Burg, 2017**).

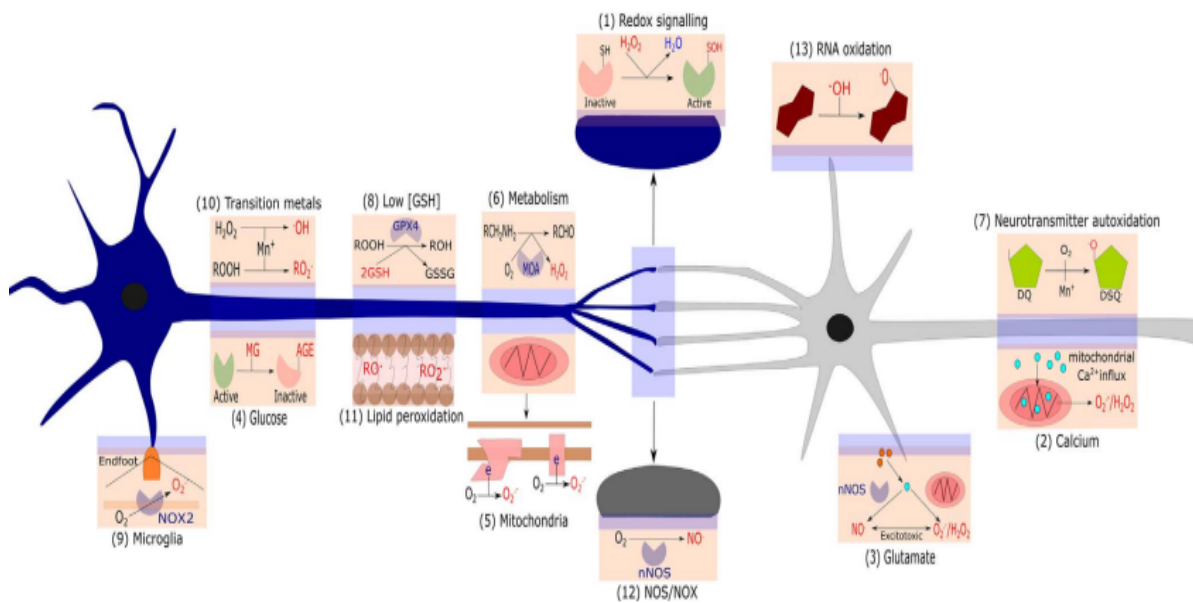


Figure 12. La susceptibilité des neurones au stress oxydatif (**Cobley et al., 2018**).

Selon Cobley *et al.* (2018), bien que pesant à peine 1400 g, le cerveau humain consomme environ 20% du budget total en oxygène de base pour alimenter ses quelque 86 milliards de neurones et leur réseau de connexion complexe couvrant des milliards de synapses et environ 250 à 300 milliards de cellules gliales. Dans les MND, le système de protection est débordé et n'arrive plus à contrer la production de ROS qui s'accumulent dans les neurones et les conduisent lentement vers leur mort, notamment par le mécanisme d'apoptose (**Reichmann et al., 2018**). L'accumulation de molécules endommagées et non réparées dans les compartiments cellulaires entraînera une perturbation de l'homéostasie (**Le Bourg, 2001**). Plusieurs marqueurs du stress oxydant ont notamment été retrouvés dans certaines MND (**Cheignon et al., 2018 ; Sivandzade et al., 2019**) (fig. 13). Les dommages au niveau de l'ADN sont clairement apparents dans le cas de la maladie de Parkinson et d'Alzheimer (**Jenner, 2003 ; Emerit et al., 2004**). Une présence accrue de fragments protéiques carbonylés indiquant des dommages protéiques a également été rapportée dans tous les troubles neurodégénératifs (**Mariani et al., 2005 ; Cheignon et al., 2018**). De plus, la quantité élevée d'acides gras polyinsaturés (AGPI) présents dans les membranes neuronales rend les tissus cérébraux particulièrement sensibles aux réactions de peroxydation lipidique, entraînant la formation

d'aldéhydes cytotoxiques, tels que le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (HNE) (Gaschler et Stockwell, 2017 ; Haq et Al Amro, 2019). Le stress oxydatif pourrait être responsable d'une perturbation de l'intégrité de la membrane. La peroxydation lipidique pourrait être impliquée dans la perte d'asymétrie phospholipidique dans les membranes synaptosomales (Castegna *et al.*, 2004). L'oxydation des lipides dans les systèmes biologiques est responsable d'une multitude d'effets nocifs sur la santé humaine tels que la carcinogénèse, l'inflammation, l'athérosclérose et le vieillissement (Stocker et Keaney, 2004). Elle peut détruire les neurones cholinergiques dans la maladie d'Alzheimer et les neurones dopaminergiques dans la maladie de parkinson (Khazdair *et al.*, 2018).

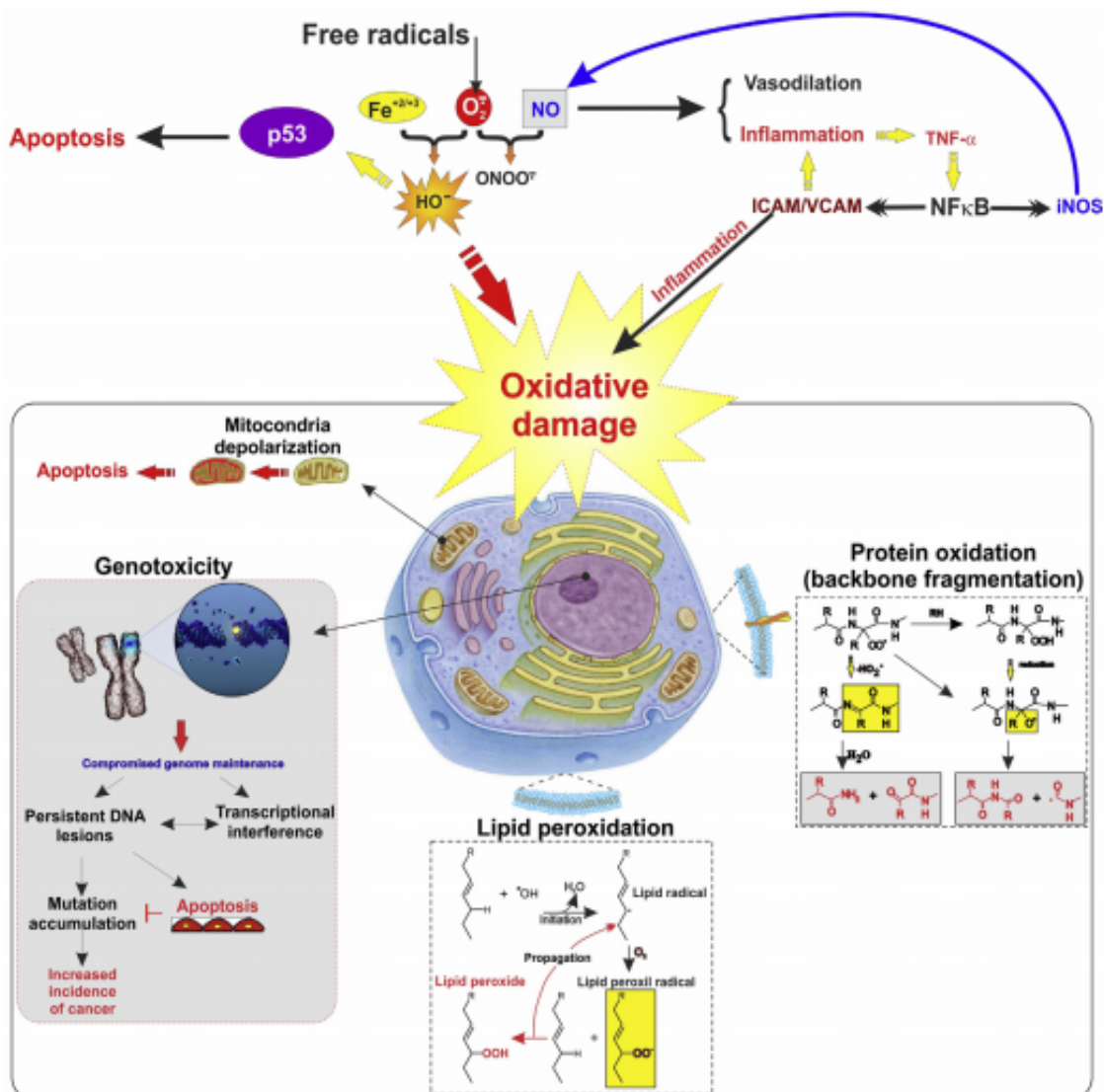


Figure 13. Stress oxydatif au niveau des biomolécules (Sivandzade *et al.*, 2019).

Les concentrations endogènes élevées d'ions métalliques Zn (0.1g/kg), Cu (0.004g/kg) et Fe (0.3g/kg), au niveau du cerveau, augmentent sa vulnérabilité au stress oxydatif (**Faller et Hureau, 2012**). La grande majorité des radicaux libres proviennent des réactions d'oxydoréduction des métaux. Le fer libre est depuis longtemps impliqué dans les maladies neurodégénératives par le biais de ses transitions redox *in vivo*. Des niveaux anormalement élevés de fer et de stress oxydatif ont été trouvés dans la plupart des troubles neurodégénératifs (**Smith et al., 2010**). La réaction subséquente du fer ferreux avec le peroxyde d'hydrogène donne le radical hydroxyle par la réaction de Fenton (**Halliwell, 2006 ; Ye et al., 2015**). Selon **Özyürek et al. (2008)**, le radical hydroxyle présente une très forte activité oxydante et induit de graves dommages aux biomolécules provoquant de nombreuses maladies à savoir l'arthrite, l'athérosclérose, la cirrhose, le diabète, le cancer, la maladie d'Alzheimer, l'emphysème et le vieillissement. En plus, les métaux de transition peuvent contribuer à la neurodégénérescence par leurs effets délétères sur la structure des protéines et des peptides conduisant au phénomène d'agrégation pathologique sources de radicaux libres (**Abuhamadah, 2014**).

Le stress oxydatif survient au début de la maladie d'Alzheimer, ce qui renforcerait son rôle dans sa pathogenèse en relation avec la présence des peptides β amyloïdes. En effet, des taux élevés de $A\beta_{1-40}$ et de $A\beta_{1-42}$ seraient associés à des taux accrus de produits d'oxydation provenant de protéines, de lipides et d'acides nucléiques dans l'hippocampe et le cortex d'une personne atteinte de cette lésion (fig. 14) (**Butterfield et Lauderback, 2002 ; Cheignon et al., 2018**). Le stress oxydant pourrait être une cause de l'agrégation des protéines puisqu'en modifiant les protéines par oxydation, ces dernières ne peuvent pas se replier correctement et auront donc tendance à s'agréger (**Brown et al., 2005**).

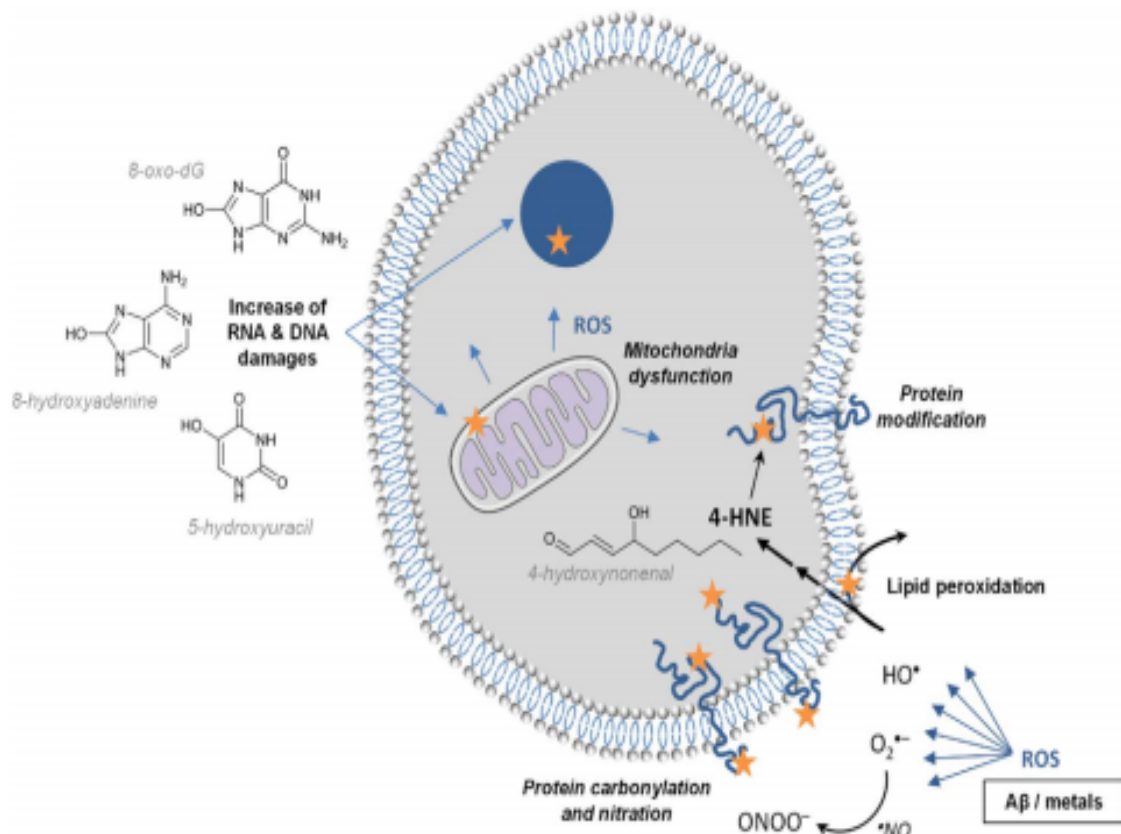


Figure 14. Stress oxydatif induit par les peptides β Amyloïdes dans une cellule du cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer. 4-HNE = 4-hydroxynonéal ; 8-oxo-dG = 8-oxo-déshydroguanine (Cheignon *et al.*, 2018).

Un dysfonctionnement mitochondrial a également été impliqué dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives via la génération de ROS mitochondriale (Zhao et Zhao, 2013 ; Selfridge *et al.*, 2013). Par ailleurs, les mitochondries sont l'une des principales cibles des attaques des ROS et par conséquent le dysfonctionnement mitochondrial est associé à la progression du vieillissement et à la manifestation de plusieurs troubles neurodégénératifs (Sohal, 2002). Les éléments mitochondriaux tels que les lipides, les enzymes de phosphorylation oxydative et l'ADN mitochondrial sont particulièrement prédisposés aux attaques des ROS en raison de leur proximité avec le site de production de ces espèces (Pieczenik et Neustadt, 2007). D'autant plus que les mitochondries sont les organites clés pour la production d'ATP, la réduction de l'apport énergétique dû à l'endommagement de ces organites conduira à une réduction des fonctions neuronales et finalement cérébrales, y compris une altération cognitive (Schmitt-schillig *et al.*, 2005).

Lorsqu'elles sont produites en excès, les ROS peuvent causer des lésions tissulaires, tandis que ces lésions peuvent elles-mêmes causer la production de ROS. Le processus inflammatoire conduit à la libération de médiateurs biologiquement actifs pour attirer les

neutrophiles, les leucocytes et les monocytes vers la zone de la plaie. Ces cellules attaquent les débris et les micro-organismes étrangers par phagocytose et ceci conduirait à la production de radicaux libres qui, en étant en excès, provoquent des lésions tissulaires s'ils submergent les antioxydants naturels de l'hôte (**Houghton et al., 2005 ; Winterbourn et al., 2016**). Bien qu'une grande partie des ROS soient produites dans les phagosomes dans le but de tuer les agents pathogènes envahissants, certaines sont également libérées dans l'environnement où elles contribuent aux dommages tissulaires fréquemment observés sur les sites d'inflammations chroniques (**Holmstrom et Finkel, 2014**).

L'apport insuffisant de nutriments, causé par une fonction cérébrovasculaire altérée, contribue à la diminution de la capacité neuronale dans le cerveau vieillissant (**Zarchin et al., 2002**). Des déficiences de certains micronutriments en particulier celles liées aux mécanismes de métabolisme antioxydant et des acides aminés, par exemple les vitamines B₁, B₂, B₆, B₉, B₁₂ et C, ont été associées à une déficience cognitive chez les personnes âgées (**Solfrizzi et al., 2011**).

2.4. Antioxydants végétaux

2.4.1. Introduction

Tout composé capable de neutraliser les ROS, sans subir lui-même la conversion en une espèce radicalaire destructrice, peut être considéré comme un antioxydant. D'après He et al. (**2012**), un antioxydant est une substance qui, lorsqu'elle est présente à de faibles concentrations par rapport à celles de substrats oxydables, retarde ou inhibe considérablement l'oxydation de ce substrat.

Les polyphénols comprennent une grande classe d'antioxydants (fig. 15) tels que les flavonoïdes, les anthocyanines, les acides phénoliques, les tanins, les lignanes et les stilbènes. Ils ont suscité un intérêt croissant de la part des scientifiques, consommateurs et des fabricants au cours des dernières décennies en raison de nombreux avantages pour la santé tels que leurs propriétés antibactériennes, anti-inflammatoires, antiallergiques, hépatoprotectrices, antithrombotiques, antivirales, anticancéreuses et vasodilatatrices (**Rodrigo et al., 2011**).

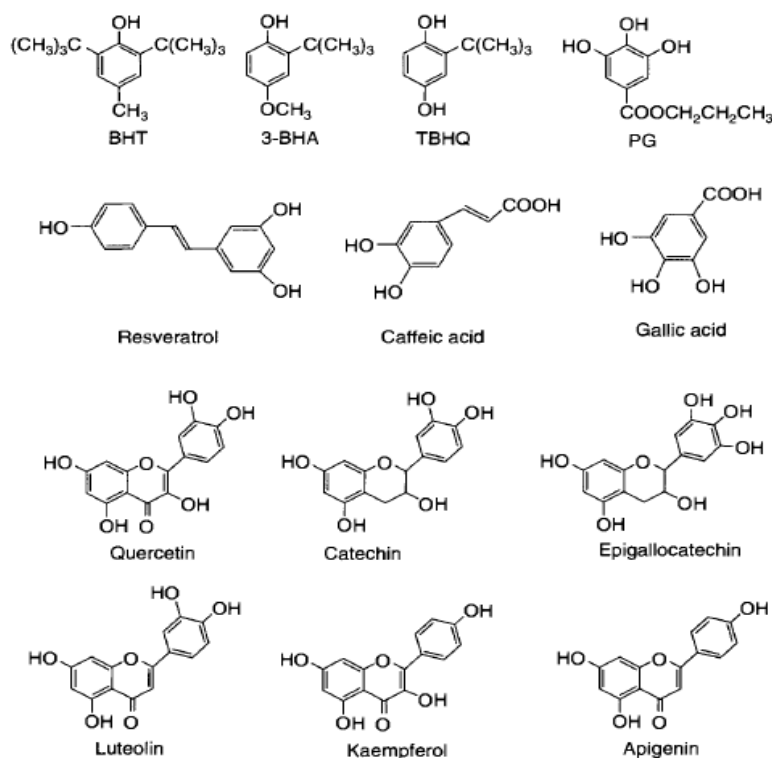


Figure 15. Les antioxydants fréquemment rencontrés (He *et al.*, 2012).

Les flavonoïdes sont de puissants antioxydants (Gu *et al.*, 2015 ; Bakoyiannis *et al.*, 2019). Le squelette flavonoïde est composé de deux cycles carbonés aromatiques : A et C (cycles benzopyrane) et B (cycle benzène) (Bakoyiannis *et al.*, 2019). Leur classification est corrélée au degré d'oxydation du cycle C, au schéma d'hydroxylation de la structure du cycle et à la substitution en 3 positions. Ainsi, la diversité du nombre et de la disposition des groupes hydroxyle, combinée à leur glycosylation et / ou alkylation, conduit à la dis-similarité entre les catégories (Ververidis *et al.*, 2007) (fig. 16).

Les acides phénoliques sont divisés en deux catégories : les dérivés de l'acide benzoïque comme l'acide gallique ou vanillique et les dérivés de l'acide cinnamique comme l'acide caféique, coumarique, sinapique et férulique. Ces derniers ont une bonne activité antioxydante (Kochetova *et al.*, 2007).

Les tanins sont des polyphénols de structure complexe, avec une activité antioxydante très puissante due au piégeage de l' $O_2^{\cdot-}$. Les deux familles les plus importantes sont les gallotanins et les ellagitanins (Anderson *et al.*, 1995).

Les stilbènes sont des polyphénols présents dans de nombreuses familles de plantes supérieures. Le resvératrol par exemple est un bon antioxydant contre l'oxydation des LDL (Wu et Hsieh, 2011).

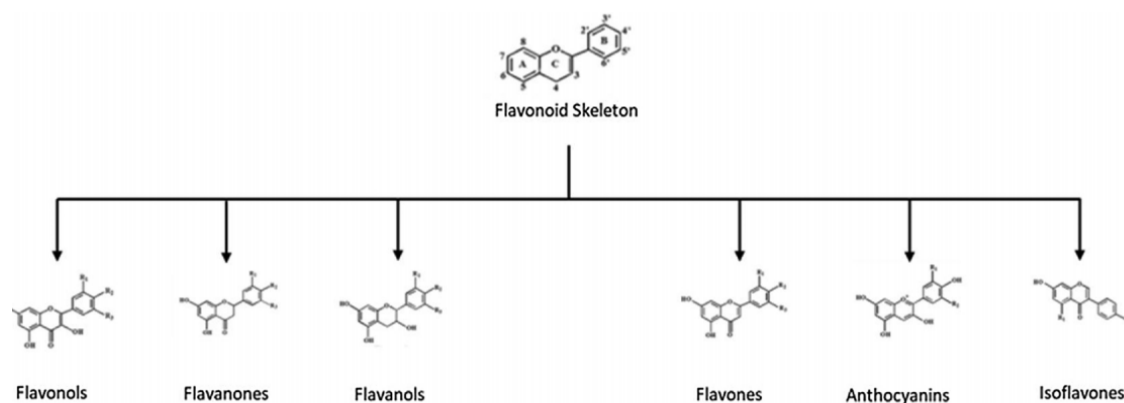


Figure 16. Structure des principales sous-classes de flavonoïdes (**Bakoyiannis *et al.*, 2019**).

Les alcaloïdes sont l'un des antioxydants majeurs dans les produits naturels, et leurs activités antioxydantes avaient été démontrées dans plusieurs études antérieures (**Yin *et al.*, 2010 ; Bousselessela *et al.*, 2013 ; Gan *et al.*, 2017**).

2.4.2. Mode d'action des antioxydants

2.4.2.1. Réaction d'oxydo-réduction

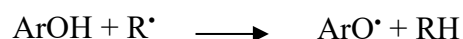
Une réaction d'oxydo-réduction est une réaction chimique au cours de laquelle se produit un transfert d'électrons pouvant s'accompagner par un transfert de protons. L'espèce chimique qui capte les électrons est appelée « oxydant » ; celle qui les cède, « réducteur ». Donc, le réducteur s'oxyde (réaction d'oxydation), l'oxydant se réduit (réaction de réduction). L'oxydo-réduction se compose donc de deux demi-réactions : une oxydation et une réduction (**Bouguerne, 2012**).

2.4.2.2. Mécanisme antioxydant

Les principaux oxydants dans les milieux biologiques sont les radicaux libres et les métaux de transition. Les antioxydants, principalement les polyphénols, désactivent les radicaux libres via trois mécanismes :

2.4.2.2.1. Transfert d'atome d'hydrogène

L'antioxydant phénolique agit avec le radical libre par transfert d'un atome d'hydrogène via la rupture homolytique de la liaison O-H



Les produits de cette réaction sont la forme réduite (RH) du radical néfaste, et le radical ArO^\bullet (forme oxydée de l'antioxydant). Bien que cette réaction donne naissance à un autre radical libre, celui-ci est moins réactif (Leopoldini *et al.*, 2011).

2.4.2.2.2. Transfert mono-électronique d'électron

Dans ce mécanisme, un électron est transféré au radical libre R^\bullet . L'anion R^- et le cation radical $\text{ArOH}^{+\bullet}$ ainsi formé sont généralement des entités stables.



Le potentiel d'ionisation est le facteur déterminant du pouvoir piègeur d'électrons. Un potentiel bas implique un arrachement facile d'électron et en conséquence une réaction avec le radical libre (Leopoldini *et al.*, 2011).

2.4.2.2.3. Chélation des métaux de transition

Le dommage oxydatif est un processus multiphasique impliquant des étapes d'initiation et de propagation de la chaîne radicalaire. Un mécanisme important de l'action antioxydante est la chélation des métaux de transition, empêchant ainsi la catalyse de la décomposition du peroxyde d'hydrogène via la réaction de type Fenton (Bush, 2003). D'après Leopoldini *et al.* (2011), il y a trois sites potentiels pour que le métal se lie à la Quercétine (fig. 17)

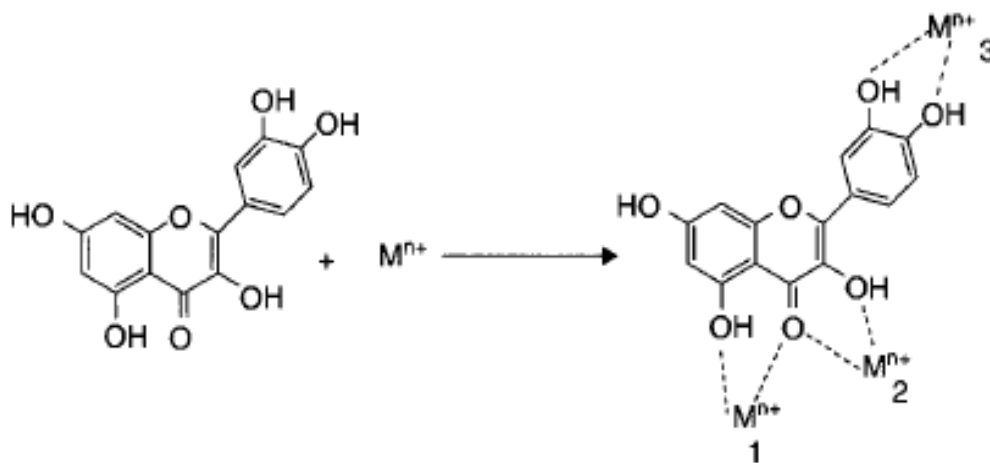


Figure 17. Mécanisme de chélation des métaux de transition par la Quercétine (Leopoldini *et al.*, 2011).

2.5. Exemples de quelques plantes et substances phytochimiques antioxydantes au niveau du cerveau

Crocus sativus et son composant principal, la crocine, possèdent des effets antioxydants puissants en réduisant le taux de malondialdéhyde (MDA) chez des rats exposés à un stress oxydant (Tamaddonfard *et al.*, 2013). L'administration d'extrait de *C. sativus* (100 mg/kg) avant l'induction d'une ischémie cérébrale par occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAO) réduit significativement les concentrations de glutamate et d'aspartate. Le MCAO a entraîné une diminution importante du contenu de GSH et de ses enzymes dépendantes. Les activités du Na⁺/K⁺ - ATPase, de la SOD et de la CAT ont également été considérablement réduites par ce modèle. Toutes ces altérations induites par l'ischémie ont été significativement atténuées par cet extrait (Saleem *et al.*, 2006).

Les tocols et les acides phénoliques dans l'huile de *Thymus vulgaris* peuvent réagir directement avec les radicaux libres et inhiber la peroxydation lipidique (Assiri *et al.*, 2016). L'effet neuroprotecteur de *Curcuma longa* dans la maladie de Parkinson est relié à ses propriétés antioxydantes. Wang *et al.* (2011) rapportent que le curcuma restaurait l'accumulation intracellulaire des ROS dans des lignées cellulaires humaines SH-SY5Y exposées au 6-hydroxydopamine (6-OHDA). L'administration orale de curcuma (60 mg/kg) pendant trois semaines avait amendé la dégénération du striatum neuronal de rats suite à une lésion au 6-OHDA (Agrawal *et al.*, 2012). La plante protégeait les neurones des ROS via la restauration de la diminution du niveau du glutathion (GSH) (Harish *et al.*, 2010).

En 2004, Suzuki et ses collaborateurs, avaient administré de l'extrait de catéchine de thé à des rats pendant cinq jours avant l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAO) et re-perfusion pour examiner leurs effets protecteurs sur divers processus de détérioration après un AVC. Les catéchines avaient significativement amélioré les déficits neurologiques observés après re-perfusion par l'inhibition de l'expression de l'oxyde nitrique synthétase (iNOS) et l'infiltration des neutrophiles. De plus, la formation de peroxy-nitrite s'est avérée être diminuée en raison des puissantes propriétés de piégeage des radicaux libres par cette molécule.

Selon Vausour *et al.* (2017), bien que les polyphénols puissent exercer certains de leurs effets neuroprotecteurs en agissant directement comme antioxydants, ils ont probablement d'autres effets importants, tels que l'élimination des espèces réactives de l'azote et l'activation de la signalisation cellulaire qui régulent la production de radicaux libres. Les polyphénols répriment les gènes impliqués dans les ramifications du stress oxydatif tout en induisant des programmes d'expression des gènes antioxydants et détoxifiants (Pietta *et al.*, 2000 ; Vausour

et al., 2012). Selon Vauzour *et al.* (2012), de faibles niveaux de ces composés phénoliques semblent activer le facteur de transcription Nrf2. Ce facteur induit la production d'enzymes antioxydantes endogènes et d'autres composés protecteurs apparentés.

Ces composés réduisent la dérivation radicalaire à partir des formes non radicalaires telles que le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet et le peroxydinitrite (Quideau *et al.*, 2011). Ils peuvent également protéger et régénérer d'autres antioxydants, notamment l'acide ascorbique et le tocophérol (Pietta *et al.*, 2000).

De nombreux composés, y compris les flavonoïdes, ont été marqués en tant que suppresseurs de stress oxydatif, par exemple, en augmentant les niveaux de glutathion (GSH) (Gu *et al.*, 2015). D'après Rahigude *et al.* (2012), la narigénine contracte les niveaux élevés de peroxyde et d'oxyde nitrique chez les rats diabétiques en augmentant leur taux de glutathion. La lutéoline, pouvait atténuer les déficiences cognitives observées chez les rats obèses en diminuant les indicateurs de stress oxydatif (Liu *et al.*, 2013). L'hespéritine augmentait les enzymes antioxydantes, SOD, GSH-Px, glutathion réductase, catalase et GSH dans l'hippocampe de rats contribuant ainsi à la réduction du stress oxydant (Kheradmand *et al.*, 2018). Dans des cellules PC12 (lignée de cellules tumorales), l'ajout de flavonoïdes avait supprimé l'augmentation des ROS induite par l'hydroperoxyde, une espèce oxydante physiologiquement pertinente impliquée dans la pathologie de la paroi vasculaire (Van der Loo *et al.*, 2000 ; Dajas *et al.*, 2003) et la neurodégénérescence (Szabo *et al.*, 2007).

Les flavonoïdes sont susceptibles de combattre la dysfonction neuronale et la toxicité en augmentant l'expression des gènes antioxydants (Williamson *et al.*, 2012). Wang *et al.* (2001) avaient étudié l'effet de plusieurs flavonoïdes sur la cytotoxicité induite par les peptides beta amyloïdes sur les neurones corticaux. La Pré-incubation de ces cellules avec 50 µM de kaempférol, d'apigénine, de lutéoline et de quercétine avaient significativement réduit l'augmentation de la production des ROS issue de l'agrégation des plaques séniles. Selon Schmitt-schillig *et al.* (2005), la myricétine, la morine et la quercétine inhibaient non seulement la formation et l'extension des fibrilles beta amyloïdes mais aussi les fibrilles préformées qui étaient déstabilisées avec des concentrations efficaces de l'ordre de 0,1-1 µM. Un autre effet bénéfique des flavonoïdes est de diminuer l'oxydation des lipides membranaires. Par exemple, la gossypine avait inhibé de façon spectaculaire la peroxydation des lipides initiée par Fe²⁺ et l'acide ascorbique dans des homogénats de cerveau de rat (Schmitt-schillig *et al.*, 2005). Les flavonoïdes peuvent simultanément piéger les métaux de transition et les empêcher de prendre part aux réactions générant des radicaux libres ; la chélation de ces métaux peut effectivement

réduire l'oxydation. Selon Arora *et al.* (1998), le nombre des groupes OH et leurs positions sur l'anneau de la molécule déterminent la capacité de chélation des flavonols.

Les anthocyanidines inhibaient, elles aussi, la peroxydation lipidique induite par H₂O₂ dans les homogénats de cerveau de rats (Schmitt-schillig *et al.*, 2005).

D'après plusieurs auteurs les alcaloïdes sont, eux aussi, de puissants antioxydants (Yin *et al.*, 2010 ; Choi *et al.*, 2012 ; Bousselessela *et al.*, 2013 ; Gan *et al.*, 2017). L'extrait liposoluble de *Lepidium meyenii*, réduisait le taux de lactate déshydrogénase sérique et la peroxydation des lipides musculaires en augmentant le glutathion total hépatique et musculaire chez des rongeurs exposés à un stress oxydatif. Cette plante contient des alcaloïdes tels que le N-benzylhexadécaneamide et le N-benzyl-5-oxo-6E, 8E-octadécadiénamide, ce qui suggère que l'effet antioxydant de cet extrait peut être en partie attribué à ces molécules (Choi *et al.*, 2012). Les alcaloïdes semblent avoir un pouvoir antioxydant plus fort que celui des phénols (Gan *et al.*, 2017). Selon Du (2011), les alcaloïdes extraits de *Lepidium meyenii* à une concentration de 62,4%, étaient considérés comme la principale substance antioxydante en raison de la corrélation entre les alcaloïdes et la capacité de piégeage du radical DPPH. D'après Bousselessela *et al.* (2013), les alcaloïdes extraits de *Euphorbia granulata* avaient montré une grande activité antiradicalaire contre les radicaux libres DPPH.

2.6. Neurotoxicité, neuroprotection et plantes neuroprotectrices

2.6.1. Neurotoxicité

Le cerveau humain reste généralement sain sur le plan structurel et fonctionnel pendant plusieurs décennies, malgré le caractère post-mitotique et non régénératoire des neurones. Cela témoigne de la capacité profonde du cerveau à l'homéostasie : les neurones et la glie possèdent des mécanismes intégrés qui leur permettent de mettre en place des réponses adaptatives ou protectrices à des situations potentiellement difficiles, garantissant ainsi le maintien de la viabilité et de la fonctionnalité cellulaires. Cependant certaines substances, dites neurotoxiques, ont la capacité de perturber cet équilibre (Baxter et Hardingham, 2016).

La cytotoxicité est la propriété qu'a un agent chimique ou biologique de provoquer des altérations cellulaires en aboutissant à leur destruction (Dausset, 1976). Les facteurs neurotoxiques sont principalement impliqués dans la perte progressive de neurones (Sowndhararajan *et al.*, 2018). Leur mécanisme d'action implique une perturbation de la membrane cellulaire provoquant une fuite du contenu cellulaire ou bien l'inhibition des fonctions vitales comme le transport d'ion ou la transduction du signal (Xu *et al.*, 2004).

2.6.2. Neuroprotection

La neuroprotection désigne les stratégies et les mécanismes relatifs capables de défendre le système nerveux central (SNC) contre une lésion neuronale due à des troubles aigus tels que l'accident vasculaire cérébral ou le traumatisme et des troubles chroniques comme l'Alzheimer et la maladie de Parkinson. Parmi ces stratégies, la phytothérapie peut représenter une précieuse ressource dans la prévention plutôt que dans la thérapie de certaines maladies du SNC (**Iriti *et al.*, 2010**). Un neuroprotecteur est généralement défini comme un agent qui prévient la mort neuronale en inhibant une ou plusieurs des étapes pathophysiologiques dans les processus qui suivent une lésion du système nerveux, une ischémie ou l'application de neurotoxines. La définition inclut des interventions qui ralentissent ou stoppent la progression de la dégénérescence neuronale (**Abuhamdah, 2014**).

Les dommages et la mort des cellules neuronales sont principalement responsables de nombreux troubles neurodégénératifs (**Chen *et al.*, 2016**). À cet égard, la principale cible des agents neuroprotecteurs est de protéger le système nerveux central contre les dommages causés aux cellules neuronales par les lésions cérébrales aiguës ainsi que les maladies neurodégénératives chroniques (**Pak *et al.*, 2016**).

En médecine traditionnelle, un grand nombre de plantes neuroprotectrices ont été utilisées pour soigner des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (MA) et d'autres troubles liés à la mémoire.

2.6.3. Rôle de quelques plantes et substances phytochimiques dans la neuroprotection.

Dans un effort de compréhension physiologique et physiopathologique des fonctions cognitives et la recherche de nouvelles molécules qui s'avéraient neuroprotectrices, les chercheurs avaient utilisé divers composés souvent dérivés de l'environnement, par exemple des espèces végétales, également appelés nutraceutiques (fig. 18).

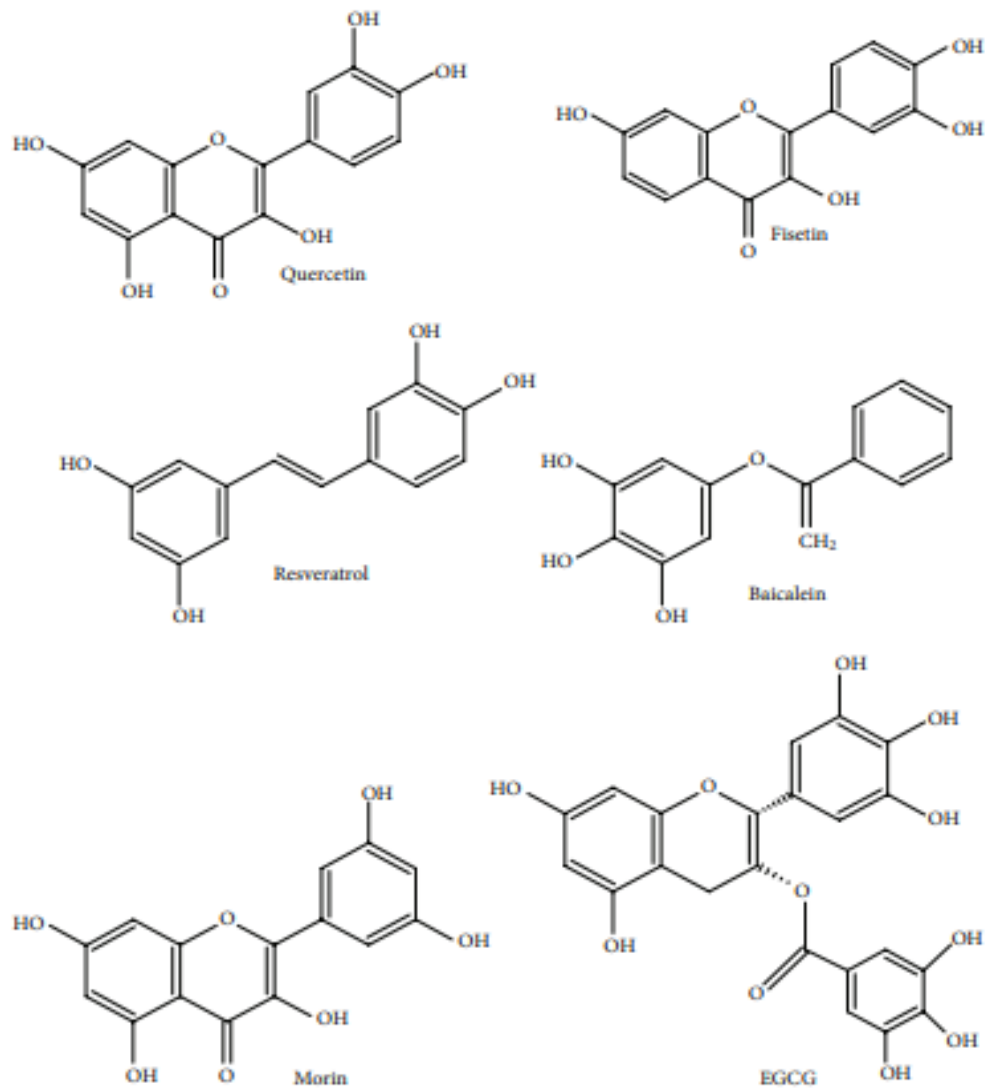


Figure 18. Structure chimique des polyphénols à usage thérapeutique dans les maladies neurologiques liées à l'âge (Bhullar et Rupasinghe, 2013).

2.6.3.1. Effet neuroprotecteur des polyphénols

Les polyphénols sont un groupe de composés phytochimiques naturels, présents en grandes quantités dans les fruits et légumes. Ils peuvent être combinés à du sucre, sous forme de glycosides, et sont généralement situés dans la vacuole des cellules végétales (Jimoh *et al.*, 2010). Ils contribuent à la prévention des maladies chroniques liées à l'âge telles que les MCV, le diabète, les cancers, l'ostéoporose et les maladies neurodégénératives (Van Dam *et al.*, 2013). Dans une étude menée par Rabassa *et al.* (2015), ils avaient observé que pour les participants, ayant consommé un régime riche en polyphénols (> 600 mg/j), les risques de mortalité toutes causes confondues étaient réduits de 30% et le risque de déclin cognitif des fonctions cognitives globales diminuait de 47%. La consommation de certains aliments contenant des quantités élevées en polyphénols a été associée à une réduction de l'apparition de troubles neurologiques tels que la maladie d'Alzheimer et pour contrer le vieillissement cérébral (Bhullar et Rupasinghe, 2013 ; Corona et Vauzour, 2017) (fig. 19 et 20). Les polyphénols peuvent agir pour protéger le cerveau de plusieurs façons, notamment en protégeant les neurones vulnérables, en améliorant la fonction neuronale existante ou en stimulant la régénération neuronale (Youdim et Joseph, 2001).

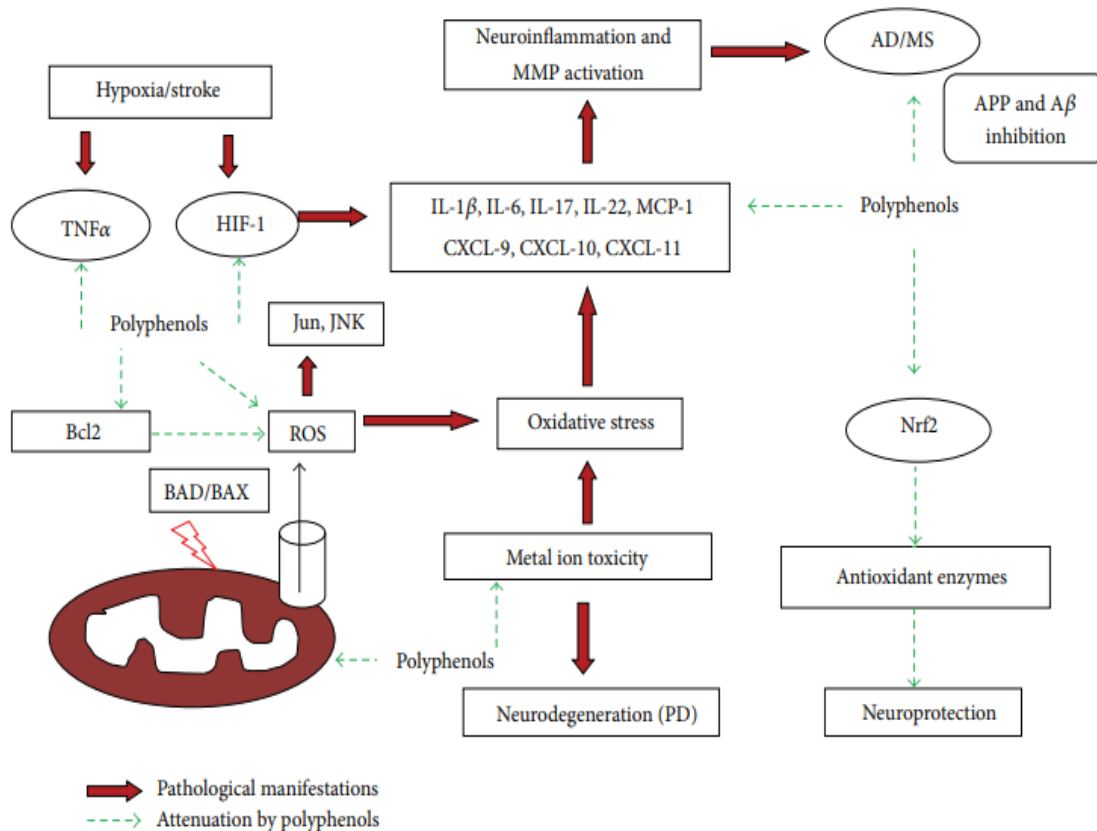


Figure 19. La neuroprotection des polyphénols contre les maladies neurodégénératives (Bhullar et Rupasinghe, 2013).

2.6.3.1.1. Effet des polyphénols sur l'inflammation

Un régime alimentaire riche en fruits et légumes influence la fonction des systèmes immunitaires réduisant ainsi l'inflammation systémique (**Esfahani et al., 2016**). Des études *in vitro* sur des modèles animaux avaient démontré que les composés anti-inflammatoires des plantes stimulent la neurogenèse et protègent les neurones contre les troubles nocifs (**Stangl et Thuret, 2009**). Les cytokines pro-inflammatoires et les gènes contribuent à l'inflammation et à la mort neuronale dans divers troubles neurologiques. La plupart des thérapeutiques ciblent les cytokines et d'autres réponses immunitaires comme une intervention thérapeutique. Les polyphénols sont bien connus pour leurs activités anti-inflammatoires, ils contrôlent la neuroinflammation et la mort neuronale (**Cavet et al., 2011**). L'EGCG inhibe les cytokines et les chemokines tels que l'IL-1 β , IL-6 et le MCP-1. Le resvératrol contrôle l'inflammation de l'hippocampe en réduisant l'expression des niveaux d'ARNm MCP-1 (**Lee et al., 2010**).

2.6.3.1.2. Effet des polyphénols sur l'activité de l'acétylcholinestérase

Les polyphénols présentent des propriétés neuroprotectrices, notamment une action thérapeutique contre la maladie d'Alzheimer et la démence. Les extraits de thé vert et blanc, très riche en ces substances, avaient inhibé l'acétylcholinestérase (AChE), ce qui indique leur potentiel dans le traitement de troubles liés à l'âge (**Okello et al., 2012**). Les Polyphénols de *Cistus laurifolius* avaient également présenté un effet inhibiteur de l'AChE en soutenant le rôle neuroprotecteur des polyphénols (**Akkol et al., 2012**).

2.6.3.1.3. Effet des polyphénols sur les mitochondries.

Le resvératrol accroît l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et baisse l'expression de la protéine Bax (**Li et al., 2012**). Le resvératrol a également agi en tant qu'antioxydant mitochondrial en élevant les niveaux d'antioxydants Trioredoxine-2 (TRX2) (**Kairisalo et al., 2011**). De même, le resvératrol contrôle le stress oxydatif dans les cellules PC12 et inhibe la voie d'apoptose mitochondriale en régulant négativement Bax et positivement Bcl-2 (**Agrawal et al., 2011**).

2.6.3.1.4. Effet des polyphénols sur les métaux de transition

L'accumulation de métaux de transition dans le cerveau contribue au développement de maladies neurodégénératives. L'EGCG avait montré une capacité de chélation du fer dans les cellules de neuroblastome SH-SY5Y ainsi que l'inhibition de facteurs apoptotiques tels que le

BCL2 (B-cell lymphoma 2), Bax (BCL2-associated X protein) et la caspase-3 (**Avramovich-Tirosh et al., 2007**).

2.6.3.1.5. Effet des polyphénols sur les canaux ioniques

Les effets neuroprotecteurs des polyphénols sont souvent attribués à leur capacité à moduler les voies de signalisation cellulaire (**Sueishi et al., 2012**). L'effet neuroprotecteur des EGCG se produit par l'inhibition des courants de calcium dépendant du voltage et des courants induits par le NMDA, ainsi que de l'élévation du Ca^{2+} par la voie de la PLC-IP₃ (**Wang et al., 2011**). Les canaux sodiques impliqués dans la pathologie de la sclérose multiple avaient été bloqué par des polyphénols du raisin comme la quercétine, la catéchine et le resvératrol (**Yao et al., 2010**). Les canaux couplés à la protéine G impliqués dans la signalisation neuronale et l'excitabilité membranaire sont activés par la naringinine montrant ainsi un potentiel d'amélioration de la cognition dans la maladie d'Alzheimer (**Yow et al., 2011**).

2.6.3.1.6. Effet des polyphénols sur la cytotoxicité induite par les peptides beta-amyloïdes

Les polyphénols agissent contre l'augmentation de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) (**Anderson et al., 2013**). De nombreuses études avaient démontré que le resvératrol qui présentait des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes, inhibait l'agrégation des protéines bêta-amyloïdes ($A\beta$) et module les effecteurs intracellulaires impliqués dans la survie ou la mort des cellules neuronales (**Bastianetto et al., 2015**). Le resvératrol a été proposé pour exercer des effets neuroprotecteurs par l'activation de SIRT1, une enzyme qui désacétyle les protéines associées à la régulation cellulaire (**Lagouge et al., 2006**). **Majlessi et al. (2012)**, avaient constaté que les déficiences de l'apprentissage et de la mémoire causés par les peptides β Amyloïdes pouvaient être rétablies par l'administration de l'huile essentielle de *Zataria multiflora* chez les rats. Les lignanes de *Schisandra chinensis* avaient montré des effets neuroprotecteurs contre la toxicité induite par le glutamate, la β amyloïde, le 6-hydroxydopamine et les lipopolysaccharides (**Song et al., 2016**). Cette plante avait montré des effets protecteurs contre diverses maladies induites par les lésions neuronales, notamment les accidents vasculaires cérébraux, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et d'autres maladies neurodégénératives (**Sa et al., 2015**).

D'autres substances phytochimiques se sont avérées neuroprotectrices. Il avait été démontré récemment chez des rats, les effets neuroprotecteurs et améliorant du thymol, monoterpène bioactif isolé du *Thymus vulgaris*, sur la déficience cognitive causée par la scopolamine (**Deng et al., 2015**). Les effets neuroprotecteurs de thymol peuvent être attribués

à son effet potentiel sur le GABA, médiateur de l'inhibition de la transmission synaptique **(Marin et al., 2011)**. Kulkarni et al. **(2012)** avaient signalé que l'extrait aqueux de *Curcuma longa* pouvait augmenter les taux de dopamine, de noradrénaline et de 5-HT dans le SNC. Elle pouvait avoir un effet inhibiteur sur la maladie de Parkinson, la production de ROS, l'apoptose, l'agrégation plaquettaire, la production de cytokines, l'activité enzymatique de la cyclooxygénase, les dommages oxydatifs du cerveau et les déficits cognitifs dans des cellules en culture et sur des modèles animaux **(Yang et al., 2014)**. Il a été démontré que la résine oléogomme de *Ferula asafoetida* pouvait améliorer la régénération et la remyélinisation et réduire l'infiltration de lymphocytes dans le tissu neuropathique chez les souris ; par conséquent, il agit comme un agent neuroprotecteur et simulateur de nerf dans la neuropathie périphérique **(Moghadam et al., 2014)**. La résine peut potentiellement inhiber la monoamine oxydase B (MAO-B) et peut être utilisée dans le traitement de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer **(Zarmouh et al., 2016)**. Les effets neuroprotecteurs de *Nigella sativa* et de son principal composant, la thymoquinone, sur divers troubles du système nerveux tels que l'épilepsie et la neurotoxicité ont été exploités **(Khazdair et al., 2015)**. *N. sativa* améliorait l'apprentissage et l'altération de la mémoire induite par la scopolamine, tout en réduisant l'activité de l'AChE et le stress oxydatif dans le cerveau de rats **(Hosseini et al., 2014)**. L'administration d'extrait de *Crocus sativus* (200 mg / kg) et de sirop de miel pendant 45 jours réduit la neurotoxicité induite par le chlorure d'aluminium chez les souris **(Shati et al., 2011)**. Récemment, les constituants de *C. sativus* ont été utilisés pour traiter certains troubles neuronaux, des propriétés anti-convulsivantes et anti-Alzheimer de l'extrait de cette drogue, dans des modèles humains et animaux ont été rapportés **(Khazdair et al., 2015)**.

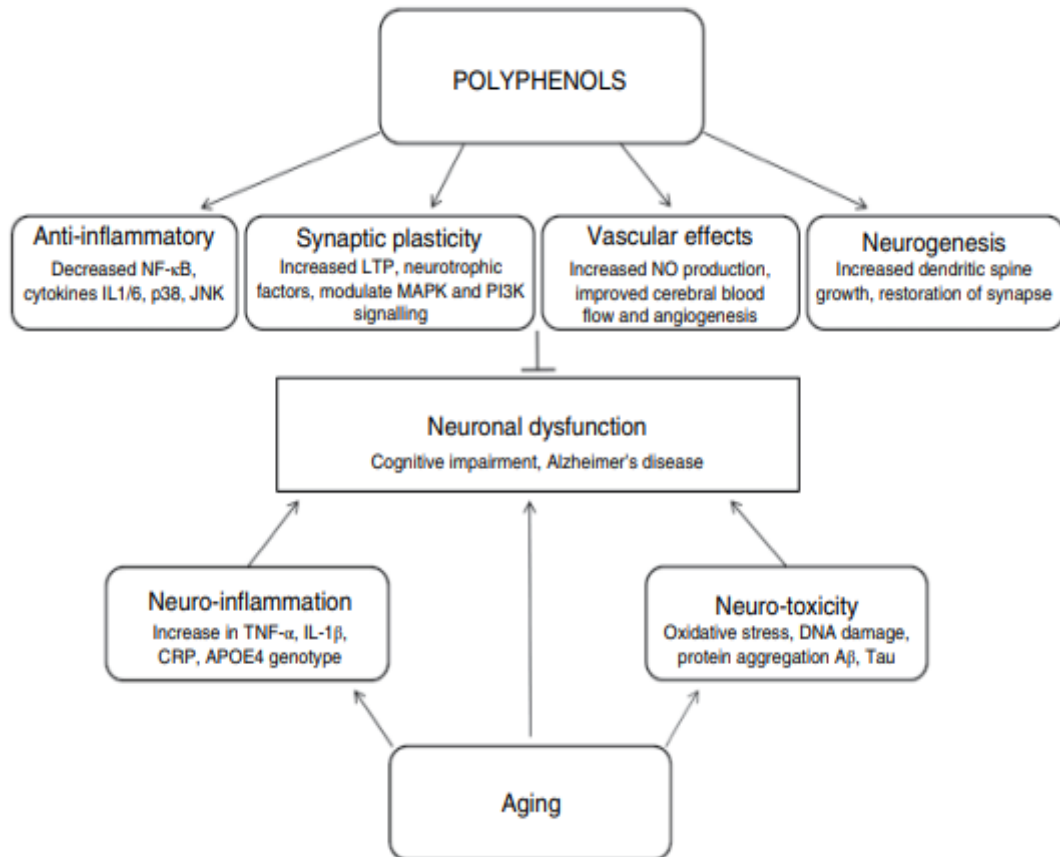


Figure 20. Représentation schématique des effets possibles du vieillissement sur les performances cognitives et des effets connus des polyphénols sur l'amélioration des diminutions cognitives (Corona et Vauzour, 2017).

NF-κB, facteur nucléaire kappa B ; IL1/6, interleukine 1/6 ; JNK, Jun kinase ; LTP, potentialisation à long terme ; MAPK, protéine kinase activée par les mitogènes ; NO, oxyde nitrique ; TNF-α, facteur de nécrose tumorale alpha ; IL-1β, interleukine 1 bêta ; CRP, réactif C protéine ; Aβ, bêta-amyloïde.

2.6.3.2. Effet neuroprotecteur des flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe important de composés polyphénoliques ayant de nombreux effets sur le comportement et la cognition (fig. 21). Ces effets varient de l'apprentissage et de l'amélioration de la mémoire à une amélioration de la cognition générale.

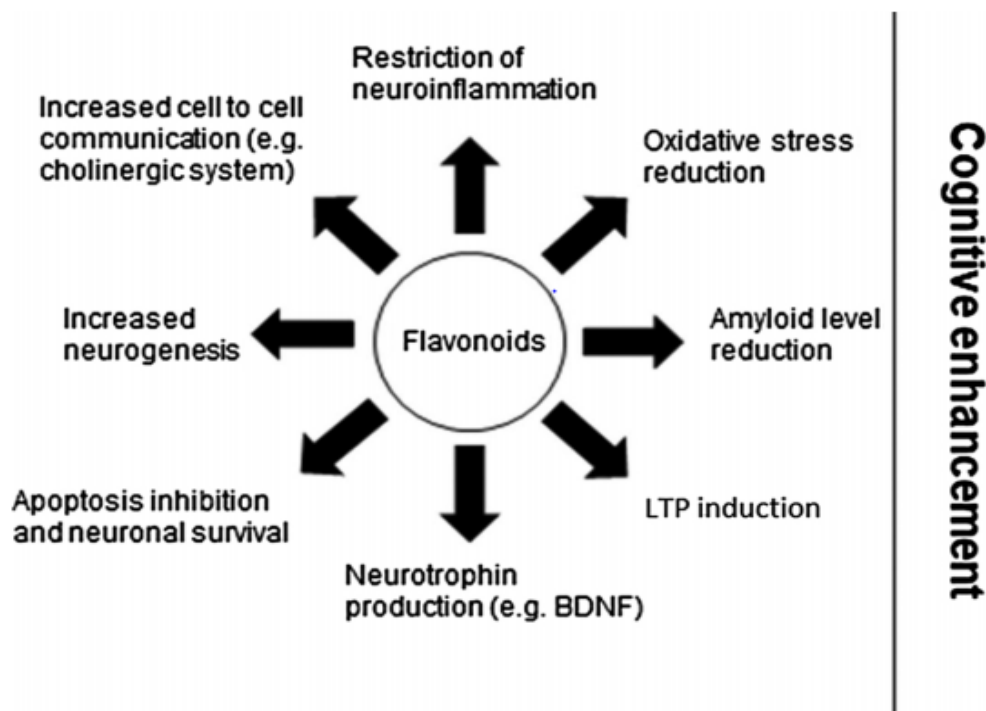


Figure 21. Principaux effets des composés flavonoïdes sur la physiologie et la physiopathologie cérébrale pouvant éventuellement contribuer à l'amélioration cognitive (Bakoyiannis *et al.*, 2019).

Des données récentes indiquent qu'un apport élevé en flavanol (495 mg) est associé à des améliorations de la fonction exécutive humaine et de la mémoire épisodique 2 h après la consommation, comparativement à un témoin à faible teneur en flavanol (23 mg) et que l'ingestion d'anthocyanes (755 mg) indiquait que des améliorations cognitives se manifestent à 5 h après l'ingestion (Lampert *et al.*, 2015). La lutéoline améliore la fonction de la mémoire spatiale, évaluée par le test de Morris (test du labyrinthe d'eau) chez des rongeurs souffrant de déclin cognitif (Liu *et al.*, 2014). Ce composé pourrait affecter une variété de neurotransmetteurs corrélés aux comportements susmentionnés, y compris les systèmes cholinergique et glutamatergique (Lin *et al.*, 2016). La lutéoline favorise l'activité de la choline acétyltransférase (ChAT), l'enzyme responsable de la production d'acétylcholine, ainsi que la réduction de son enzyme dégradante, l'acétylcholinestérase (AChE), dans l'hippocampe de rats

atteint de la maladie d'Alzheimer améliorant ainsi la communication neuronale (Yu *et al.*, 2015). Brickman *et al.* (2014) avaient démontré une amélioration de la fonction cognitive avec une préparation de cacao très riche en flavonoïdes qui était accompagnée d'une preuve fonctionnelle de l'imagerie par résonance magnétique (IRM_f) d'une activité accrue dans le gyrus denté, le site de l'hippocampe responsable de l'apprentissage et de la mémoire.

Les flavonoïdes avaient été impliqués dans la prolifération et la survie neuronale, en agissant sur une variété de cascades de signalisation cellulaire, y compris les voies ERK/CREB/BDNF et PI3K/Akt (Bakoyiannis *et al.*, 2019) (fig. 22).

Ils favorisent la potentialisation à long terme de l'hippocampe, ils ont été reconnus comme des agents prometteurs capables d'influencer différents aspects de la plasticité synaptique, améliorant ainsi la mémoire et l'apprentissage des animaux et des humains (Del Rio *et al.*, 2013). L'hespéritine et la baicaléine avaient montré leurs effets positifs sur la plasticité synaptique via l'activation de la voie PI3K dans les neurones corticaux et hippocampiques de rats (Liu *et al.*, 2010).

L'activité neuronale pendant la performance cognitive est étroitement liée à l'augmentation du débit sanguin régional, un processus connu sous le nom de couplage cérébrovasculaire (Attwell *et al.*, 2010). De tels processus sont principalement médiés par l'oxyde nitrique (NO) généré par l'activation de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) et de l'oxyde syntonique neuronale (nNOS) (Toda *et al.*, 2009 ; Huang, 2011). Des preuves substantielles supportaient les effets bénéfiques des flavonoïdes, notamment les flavanols (Schroeter *et al.*, 2010) et les anthocyanes (Rodriguez-Mateos *et al.*, 2013) sur la fonction vasculaire périphérique et le débit sanguin. Ces molécules agissent sur la biodisponibilité du NO via l'activation des eNOS (Schroeter *et al.*, 2006) et/ou de l'inhibition de l'activité NADPH oxydase (Rodriguez-Mateos *et al.*, 2013).

Des investigateurs avaient identifié, en utilisant un test de gène rapporteur APP-GAL4 dans des neurones de rongeurs primaires, un certain nombre de flavonoïdes qui inhibent puissamment l'activité de la $\beta\gamma$ secretase. Plus particulièrement, les flavanols épicatechine (EC) et épigallocatechine avaient réduit l'activité de la $\beta\gamma$ sécrétase et la production de β Amyloïdes à des concentrations nanomolaires. Une réduction de la pathologie β Amyloïdes ont également été observées suite à l'administration orale des EC à des souris mutantes APP-PS1 (Bhullar et Rupasinghe, 2013 ; Vauzour *et al.*, 2017).

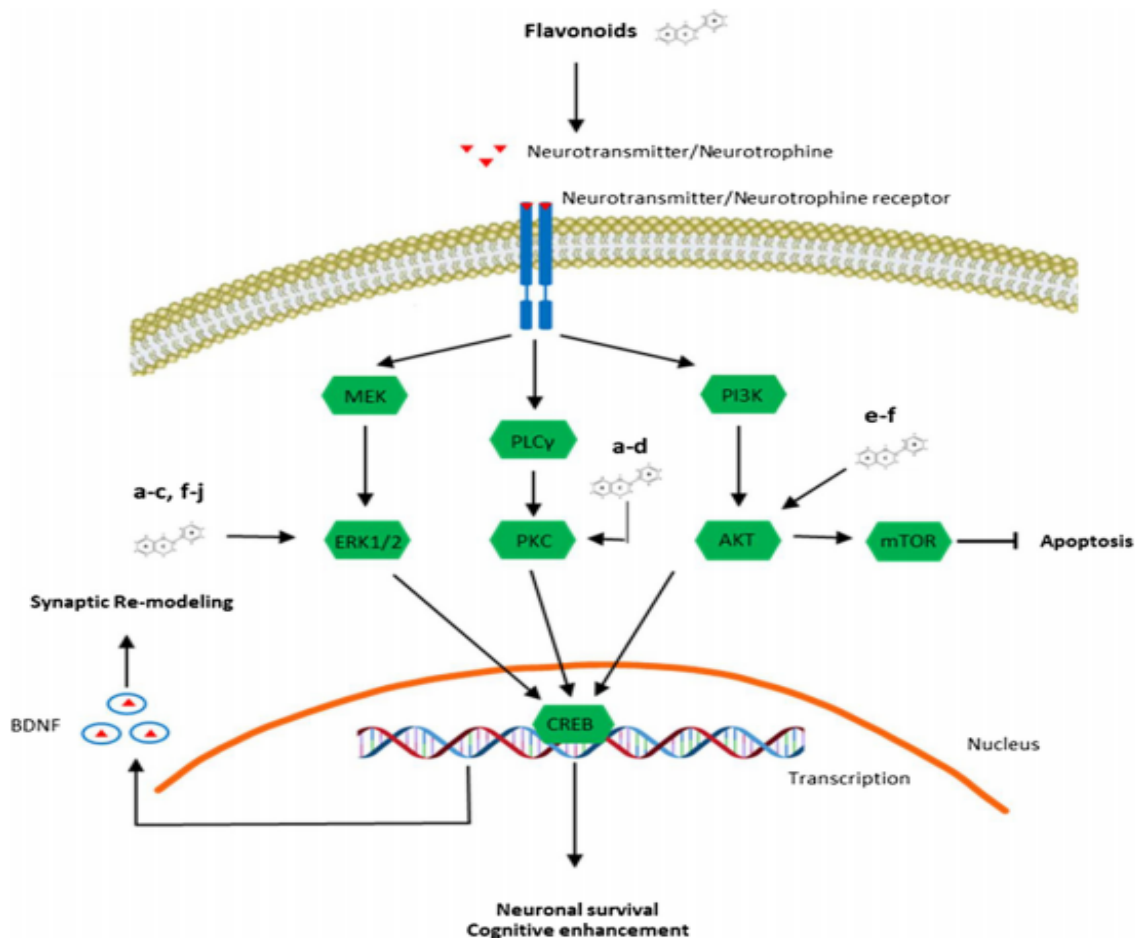


Figure 22. Voies moléculaires de la survie neuronale sur lesquelles les composés flavonoïdes semblent agir et induire leurs effets dans le cerveau (Bakoyiannis *et al.*, 2019).

a. Daidzein b. Hespérétine c. Lutéoline d. Épigallocatechine-3-gallate e. Oroxyline A f. Puerarin g. Baicalein h. Apigenin i. Fisetin j. Liquitrigenin.

Abréviations : protéine kinase activée par le mitogène (MAPK) / kinase ERK (MEK), kinases extracellulaires régulées par un signal. (ERK), phospholipase C γ (PLC γ), protéine kinase C (PKC), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), protéine kinase B (AKT), cible mammalienne de la rapamycine (mTOR), AMPc protéine de liaison aux éléments de réponse (CREB), facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF).

Williams *et al.* (2004) avaient présenté des résultats suggérant que EC inhibe l'enzyme du clivage de la protéine précurseur amyloïde du site β 1 (BACE1) (Cox *et al.*, 2015). Le métabolite de l'épicatéchine 3'-O-méthyl-épicatechine-5-O- β -glucuronide avait pu améliorer la transmission synaptique à travers le facteur de transcription de l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) (Bhullar et Rupasinghe, 2013). Fu *et al.* (2014) avaient démontré que la lutéoline baisse à la fois l'expression de l'enzyme du clivage de la β -amyloïde (BACE1) et du facteur nucléaire κ B (NF- κ B), suivie d'une élimination des peptides β A dans l'hippocampe et le cortex cérébral de rats.

La neuro-inflammation est un processus qui caractérise un certain nombre de pathologies neurodégénératives. La lutéoline atténue l'expression de l'IL-6, une interleukine 6 marqueur de l'inflammation, qui se trouve en abondance dans les microglies lors de l'inflammation (**Burton *et al.*, 2016**). Une atténuation de l'IL-6 dans les cellules microgliales survient probablement en inhibant la phosphorylation de la kinase N-terminale de c-Jun (JNK) et l'activation de la protéine activateur-1 (AP-1), qui sont toutes les deux impliquées dans l'apoptose et la neuro-inflammation (**Jang *et al.*, 2008**).

La neurogenèse chez l'adulte est un processus fortement associé à la fonction cognitive, surtout avec l'apprentissage et la formation de la mémoire (**Yamada *et al.*, 2016**). Les flavonoïdes, par exemple l'oroxyline A, la daidzéine et la myricitrine, ont été considérées comme des stimulateurs de la neurogenèse chez l'adulte survenant dans le gyrus denté de l'hippocampe, tandis que d'autres molécules telles que l'épigallocatechine-3-gallate et la spinosine, semblent être impliqués dans la différenciation neuronale et/ou la survie de nouvelles cellules (**Yamada *et al.*, 2016**). On avait constaté que la lutéoline augmentait l'épaisseur de la couche pyramidale CA1 de l'hippocampe, tandis que la myricétine, augmentait celle de CA3 et promouvait la protection neuronale chez les modèles de rongeurs atteints de la maladie d'Alzheimer (**Ramezani *et al.*, 2016**).

Par conséquent, la consommation de flavonoïdes pourrait être une direction clinique potentielle pour la prévention et/ou l'atténuation de la détérioration du déclin cognitif qui accompagne divers troubles cérébraux (**Bakoyiannis *et al.*, 2019**). D'autant plus que les flavonoïdes présentent une toxicité relativement faible par rapport à d'autres médicaments (**Ververidis *et al.*, 2007**).

2.6.3.3. Effet neuroprotecteur des alcaloïdes.

Les alcaloïdes constituent un groupe important de métabolites secondaires dans les plantes. Ils sont disponibles dans plus de 25 familles de plantes telles que Asteraceae, Piperaceae, Lauraceae, Solanaceae. Les plantes reconnues contenir des alcaloïdes sont les espèces *Anacyclus pyrethrum*, *Spilanthes acmella*, *Achillea millefolium* et *Echinacea*, toutes appartenant à la famille des Asteraceae (**Wynendaele *et al.*, 2018**).

Les alkylamides, une sous classe d'alcaloïdes, constitués d'une chaîne d'acides gras liée à une partie amide par une liaison peptidique. En raison de la diversité structurelle de ces deux parties, elles peuvent être classées en fonction de la combinaison de la chaîne des acides gras (F de 1 à 13) et de la partie amide (M de 1 à 13). Plus de 400 molécules sont déjà découvertes

et leur nom chimique, leur occurrence, leurs propriétés physicochimiques et les fonctionnalités rapportées sont rassemblées dans la base de données en ligne Alkamides (**Boonen *et al.*, 2012**).

Les Alkylamides sont connus pour leurs propriétés analgésiques, antimicrobiennes, insecticides, sensorielles, anti-inflammatoires et immunomodulatrices. Ils sont utilisés pour traiter les maux de dents, les maladies de la peau et de l'estomac, les dysfonctionnements sexuels et les infections virales (**Veryser *et al.*, 2014**).

Ces molécules avaient été également utilisées pour traiter la neurodégénérescence. Un exemple intéressant c'est la galanthamine (**Masondo *et al.*, 2019**) (fig. 23), un alcaloïde isolé des bulbes de la famille des Amaryllidacées, utilisée pour le traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer (**Scott et Goa, 2000**) (fig. 24). C'est un inhibiteur compétitif réversible de l'Acétylcholinestérase et il interagit également de manière allostérique avec les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine pour potentialiser son action. En agissant pour améliorer la fonction cholinergique centrale réduite associée aux premiers stades de cette maladie, des améliorations significatives des symptômes cognitifs et comportementaux ont été observées (**Scott et Goa, 2000**). Chez les êtres humains, la plupart des alcaloïdes affectent le système nerveux, particulièrement l'action des neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine, l'épinéphrine, la noradrénaline, l'acide gama aminobutyrique, la dopamine et la sérotonine (**Roberts Margaret et Wink, 1998**).

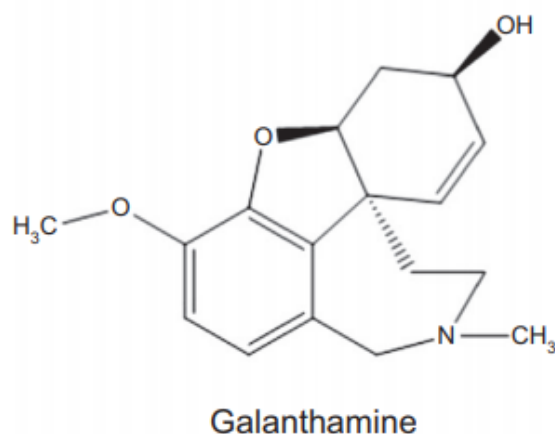


Figure23. Structures chimiques de la galanthamine (**Masondo *et al.*, 2019**).

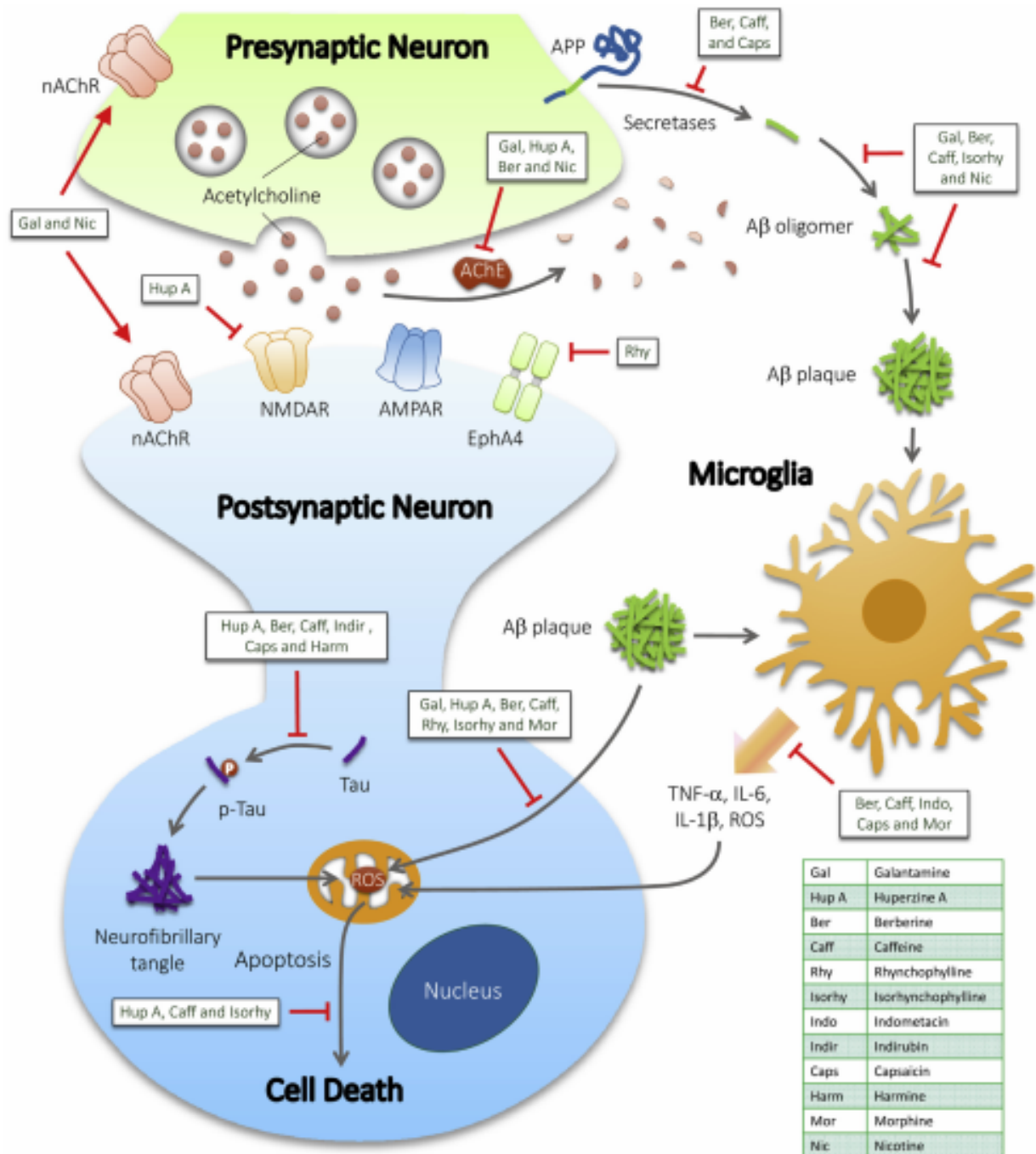


Figure 24. Différents Mécanismes d'action des alcaloïdes contre la maladie d'Alzheimer (Ng *et al.*, 2015).

Chapitre 3

**Calcium et maladies
neurodégénératives.**

3.1. Introduction

L'ion calcium (Ca^{2+}) est un second messager universel qui contrôle un très grand nombre de processus biologiques dans toutes les cellules eucaryotes (**Brini et al., 2014**). Afin de contrôler spécifiquement ces processus, la concentration de cet ion est régulée de façon très fine en amplitude et de façon spatio-temporelle. En condition de repos, la concentration de calcium libre dans le cytosol [Ca^{2+}]_i est maintenue à des niveaux très faibles (0,1 à 2 μM) par rapport à sa concentration dans le milieu extracellulaire et dans le réticulum endoplasmique (RE) (1 à 2 mM) (**Bong et Monteith, 2018**). Ce gradient de concentration rend le Ca^{2+} un peu spécial par rapport aux cations plus abondants comme le Na^+ et le K^+ car il conduit à une augmentation significative de [Ca^{2+}]_i après dépolarisation, alors que l'influx de Na^+ et de K^+ affecte de manière significative le potentiel membranaire, mais ne provoque que des modifications relativement mineures de la concentration en ions cytosoliques (**Gleichmann et Mattson, 2011**). En dépit de ce gradient de concentration important et d'un gradient électrique transmembranaire favorable, les ions Ca^{2+} ne peuvent pas entrer dans la cellule. Une quantité considérable d'énergie est dépensée pour assurer le contrôle du calcium intracellulaire car une élévation durable de celui-ci est extrêmement toxique.

3.2. Signal calcium

Le signal calcique résulte d'une élévation de la concentration du calcium cytosolique à la suite de sa libération des stocks intracellulaires, en particulier le RE, ou de son entrée depuis l'espace extracellulaire (**Bong et Monteith, 2018**). Il se manifeste par une décharge de calcium dont l'amplitude et la fréquence dépendent directement du stimulus extracellulaire. Cette décharge de calcium se propage dans toute la cellule, et contrôle les mécanismes de transduction des signaux délivrés au niveau de la membrane plasmique. Les différents stimuli sont : la dépolarisation membranaire, l'étirement mécanique, les agonistes extracellulaires, les messagers intracellulaires, et l'épuisement des réserves de Ca^{2+} intracellulaires (**Zundorf et Reiser, 2011**).

Les canaux ioniques, les échangeurs et les pompes dans la membrane plasmique, les membranes des mitochondries, du réticulum endoplasmique (RE), de l'appareil de Golgi et du noyau contribuent et/ou constituent la boîte à outils Ca^{2+} où l'ensemble associé à l'action des récepteurs couplés à la protéine G, les protéines de liaison au Ca^{2+} et les réseaux de transcription orchestreront les processus neuronaux régulés par cet élément (fig. 25) (**Brini et al., 2014**).

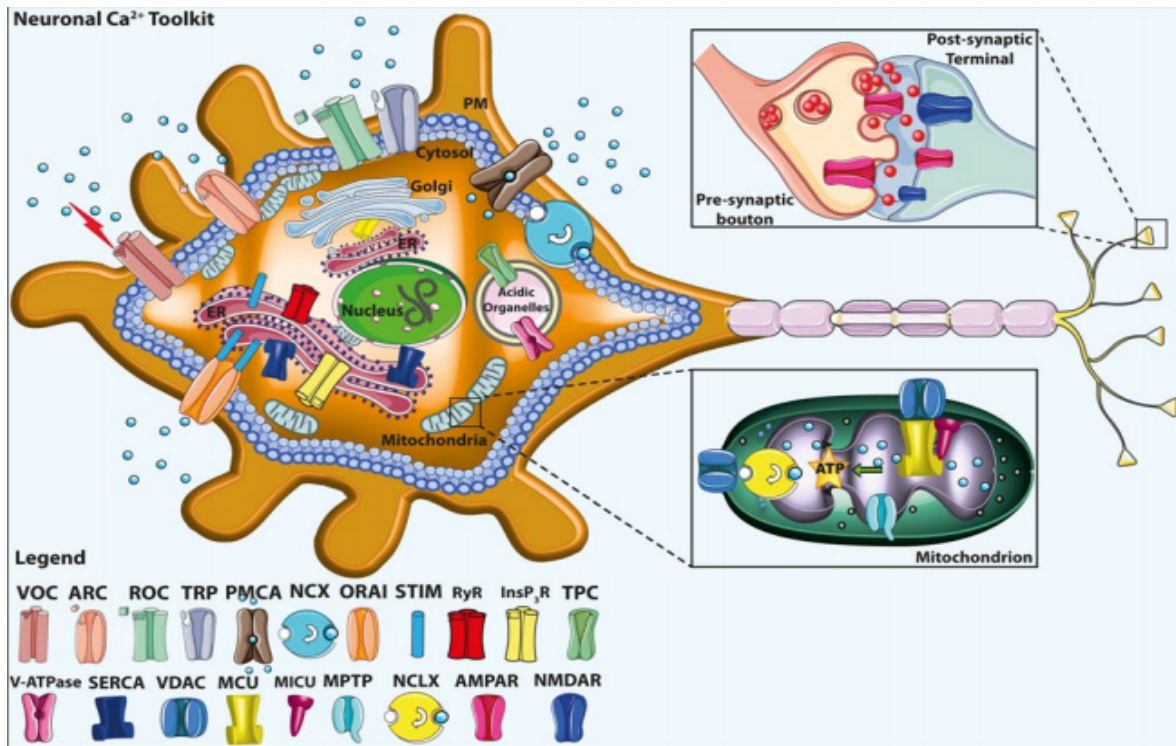


Figure 25. Boîte à outils du signal calcique neuronal (Brini *et al.*, 2014).

Le niveau de Ca^{2+} cytoplasmique est faible dans les cellules au repos. Il est maintenu à environ 100 nM (fig. 26A). Lors de la stimulation neuronale, provoquée par des variations de tension (voltage) ou par la liaison d'un ligand extra ou intracellulaire (fig. 26B), des canaux ioniques situés dans la membrane plasmique s'ouvrent et les ions Ca^{2+} passent dans le cytoplasme. Le flux calcique est d'environ un million d'ions de Ca^{2+} /s/canal (Clapham, 2007).

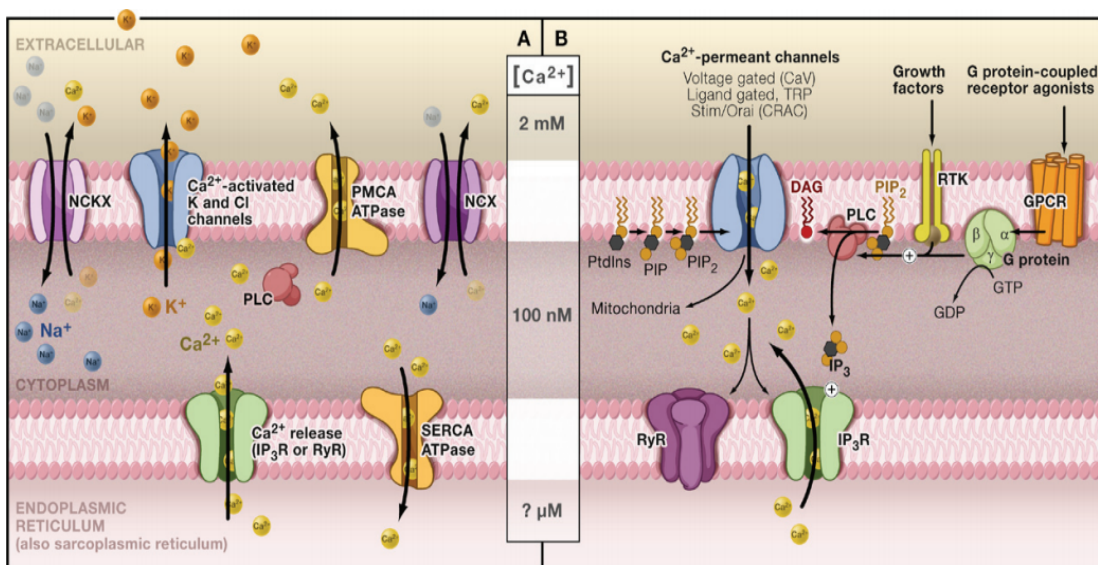


Figure 26. Maintenance et utilisation des gradients de Ca^{2+} pour la signalisation (Clapham, 2007).

L'entrée du Ca^{2+} dans les neurones excités est assurée par les canaux de Ca^{2+} voltage-dépendants (VGCC ou VOC) (fig. 26), abondants dans le soma cellulaire, les dendrites et les terminaisons nerveuses (**Lai et Jan, 2006**). Ces canaux s'ouvrent lors d'une dépolarisation de la membrane plasmique, principalement en fonction d'un gradient électrochimique créé par la différence de charges entre le milieu intracellulaire et extracellulaire, appelé le potentiel membranaire (**Bootman et al., 2012**). Les VGCC transmettent les signaux électriques produits à la surface des membranes cellulaires due à l'augmentation locale de Ca^{2+} intracellulaire. Dans les neurones, les VGCC jouent un rôle dans la génération et la propagation de l'influx nerveux et dans l'homéostasie cellulaire. Ils sont divisés en trois sous-familles, à savoir, Cav1, Cav2 et Cav3 (**Brini et al., 2014**).

Les ROC (receptor-operated Ca^{2+} channels) sont activés par la liaison de ligands spécifiques, tels que les neurotransmetteurs, à leur domaine extracellulaire. Le L-glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur dans le cerveau des mammifères, il active deux classes de récepteurs, les récepteurs ionotropes (iGluR) et les récepteurs métabotropes (mGluR). Les récepteurs sensibles à l'acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique (AMPA) et les récepteurs sensibles au N-méthyl-D-aspartate (NMDAR) sont les deux principaux types de récepteurs ionotropes du glutamate. Les mGluR sont couplés aux protéines G (**Buyck, 2008 ; Bootman et al., 2012**).

Une troisième entrée de Ca^{2+} à travers des canaux appelés SOC (store operated Ca^{2+} entry channels) (fig. 27), en réponse à l'épuisement du stock de calcium dans le réticulum endoplasmique ou dans d'autres compartiments cellulaires (**Brini et al., 2014**). La sous-unité formant les canaux SOC a été identifiée en 2006 et baptisée Orai1/CRACM1 (**Feske et al., 2006 ; Wegierski et Kuznicki, 2018**). L'activation de Orai1 est faite par une molécule d'interaction stromale 1 (STIM1), une protéine intégrée dans la membrane du RE (**Roos et al., 2005 ; Wegierski et Kuznicki, 2018**).

Un autre groupe de canaux d'entrée de Ca^{2+} , c'est la famille des récepteurs transitoires potentiels (TRP) (fig. 27). Les TRP sont une classe de canaux pouvant générer des changements dans la concentration de Ca^{2+} intracellulaire, soit directement en agissant comme voie d'entrée du Ca^{2+} ou indirectement en provoquant une dépolarisation cellulaire qui déclenche l'activation des canaux ioniques dépendants du voltage (VGCC). Il faut mentionner que la plupart des canaux TRP sont également localisés dans les membranes du RE et de l'appareil de Golgi (**Brini et al., 2014**). Ce sont des canaux nombreux et largement exprimés, mais les plus

importants pour la fonction neuronale sont les sept membres de la sous-famille des canaux TRP (TRPC1-7) (Sawamura *et al.*, 2017). Par exemple, le TRPM2 fournit une voie d'entrée du Ca^{2+} lorsque la concentration cytosolique du métabolite adénosine diphosphate ribose (ADPR) est en hausse. L'influx de Ca^{2+} via le TRPM2 provoque une augmentation importante du Ca^{2+} cytosolique et l'apoptose (Bootman *et al.*, 2012).

Il existe d'autres canaux tels que, les canaux Ca^{2+} régulés par l'acide arachidonique (ARC) (fig. 27). Ces canaux sont de faible conductivité et de forte sélectivité aux ions calcium (Thompson *et al.*, 2013).

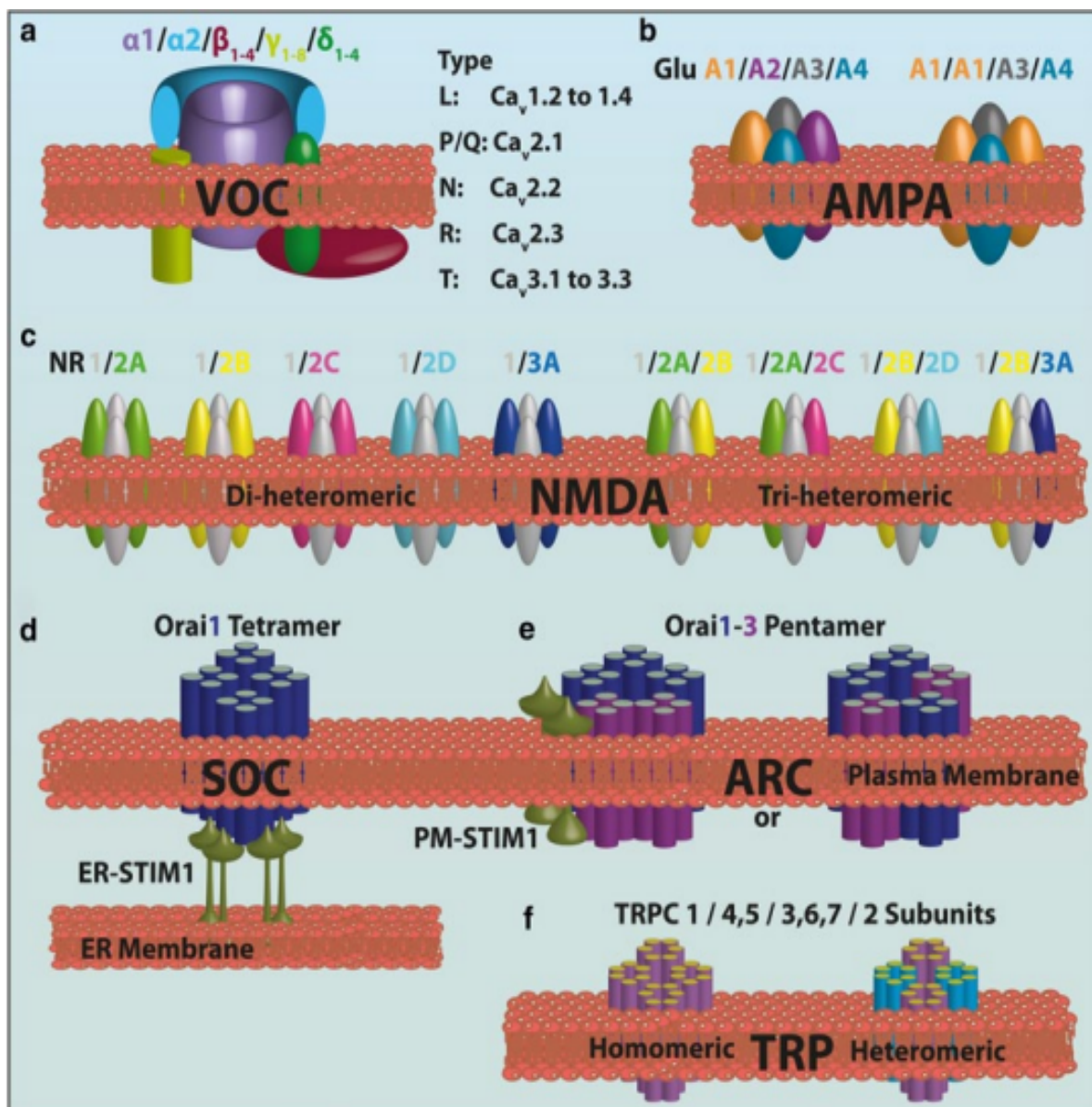


Figure 27. Assemblage et sous-types des sous-unités des principaux canaux calcium neuronaux (Brini *et al.*, 2014).

Lors de la stimulation des neurones, le Ca^{2+} stocké est simultanément libéré du réticulum endoplasmique via les canaux Ca^{2+} /récepteurs : récepteurs de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3R) et les récepteurs de la ryanodine (RyR) (fig. 27B) (Clapham, 2007 ; Takeshima *et al.*, 2015). La libération du calcium par les récepteurs IP_3R nécessite la liaison d'un second messenger, l' IP_3 , en réponse à l'activation de divers récepteurs couplés aux protéines G, localisés sur la membrane cellulaire (GPCR) (Brini *et al.*, 2014). L'augmentation de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} est l'un des principaux déclencheurs de la libération de ces ions via les RyR, le phénomène connu sous le nom de libération du calcium induite par le calcium (CICR) (Takeshima *et al.*, 2015).

Dans les neurones, le réticulum endoplasmique forme un vaste réseau continu qui atteint les terminaisons axonales et la plupart des épines dendritiques (Wu *et al.*, 2017). Ainsi, ses réserves en Ca^{2+} sont présentes dans tous les compartiments neuronaux qui sont cruciaux pour la neurotransmission. Dans les neurones au repos, les niveaux de Ca^{2+} dans le RE sont relativement bas, mais ce dernier peut rapidement s'en approvisionner suite à un afflux de cet élément à partir de l'espace extracellulaire lors d'une dépolarisation cellulaire (Lalonde *et al.*, 2014).

Les NCX mitochondriaux (NCLX) régissent l'efflux de Ca^{2+} des mitochondries (Palty *et al.*, 2010). Cet efflux peut également être provoqué par l'ouverture des pores de perméabilité de transition mitochondriaux (mitochondrial permeability transition pore) (mPTP) (Bernardi, 2013).

3.3. Homéostasie calcique

Pour éviter que la cellule soit exposée trop longtemps à des niveaux de Ca^{2+} élevés, suite à une dépolarisation membranaire par exemple qui mèneraient à l'apoptose, la cellule doit tenter de rétablir des niveaux de Ca^{2+} cytosoliques adéquats. Pour parvenir à cette homéostasie, la cellule est dotée de plusieurs mécanismes (fig. 28).

3.3.1. Uniporteur de calcium mitochondrial (MCU)

La mitochondrie constitue un organite d'accumulation de calcium pouvant contrôler à la fois l'amplitude, la durée, la localisation et la propagation des élévations calciques cytosoliques, et le recyclage du Ca^{2+} . L'uniporteur de calcium mitochondrial joue un rôle important dans l'élimination des aberrations en calcium cytosolique. Ces canaux interviennent dans l'entrée du Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale, entraînée par le potentiel négatif membranaire, généré par l'activité des composants de la chaîne respiratoire de la membrane

interne (**Raffaello et al., 2013**). L'accumulation du Ca^{2+} par les mitochondries est assurée par l'élévation localisée de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ à proximité des canaux calciques de la membrane cytoplasmique et de la membrane du RE et par les sites de contact entre les mitochondries et le RE (**Bong et Monteith, 2018**). L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale stimule l'activité de trois enzymes du cycle de l'acide tricarboxylique : la pyruvate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase et l' α -cétoglutarate déshydrogénase, en se liant directement à l'enzyme, améliorant ainsi la production d'ATP et l'élimination du Ca^{2+} cytosolique par les pompes Ca^{2+} -ATPase vers le réticulum endoplasmique et au-delà de la membrane plasmique (**Brini et al., 2014**).

3.3.2. Pompes Ca^{2+} - ATPase de la membrane plasmique (PMCA)

Les pompes PMCA appartiennent à la famille des ATPases de type P, caractérisées par la conservation temporaire de l'énergie de l'ATP sous la forme d'un intermédiaire enzymatique phosphorylé formé entre le γ -phosphate d'ATP hydrolysé et un résidu D invariant dans une séquence hautement conservée des molécules de pompe (**Brini et al., 2014**). Les PMCA, situées sur la membrane plasmique, transportent le Ca^{2+} intracellulaire à l'extérieur de la cellule. D'après Gleichmann et Mattson (**2011**), une signalisation calcique de forte intensité nécessite une consommation élevée d'ATP pour rétablir les niveaux bas de Ca^{2+} intracellulaire. La PMCA est activée par la calmoduline en présence d'ions Ca^{2+} . En absence de calcium, un domaine de l'extrémité C-terminale de la PMCA est considéré comme auto-inhibiteur. La liaison de la calmoduline à cette extrémité lève cette inhibition d'où une augmentation de la sortie de calcium (**Strehler et al., 2007**). Les PMCA ont une forte affinité pour le Ca^{2+} mais une faible capacité de transport de ce dernier (**Brini et al., 2014**).

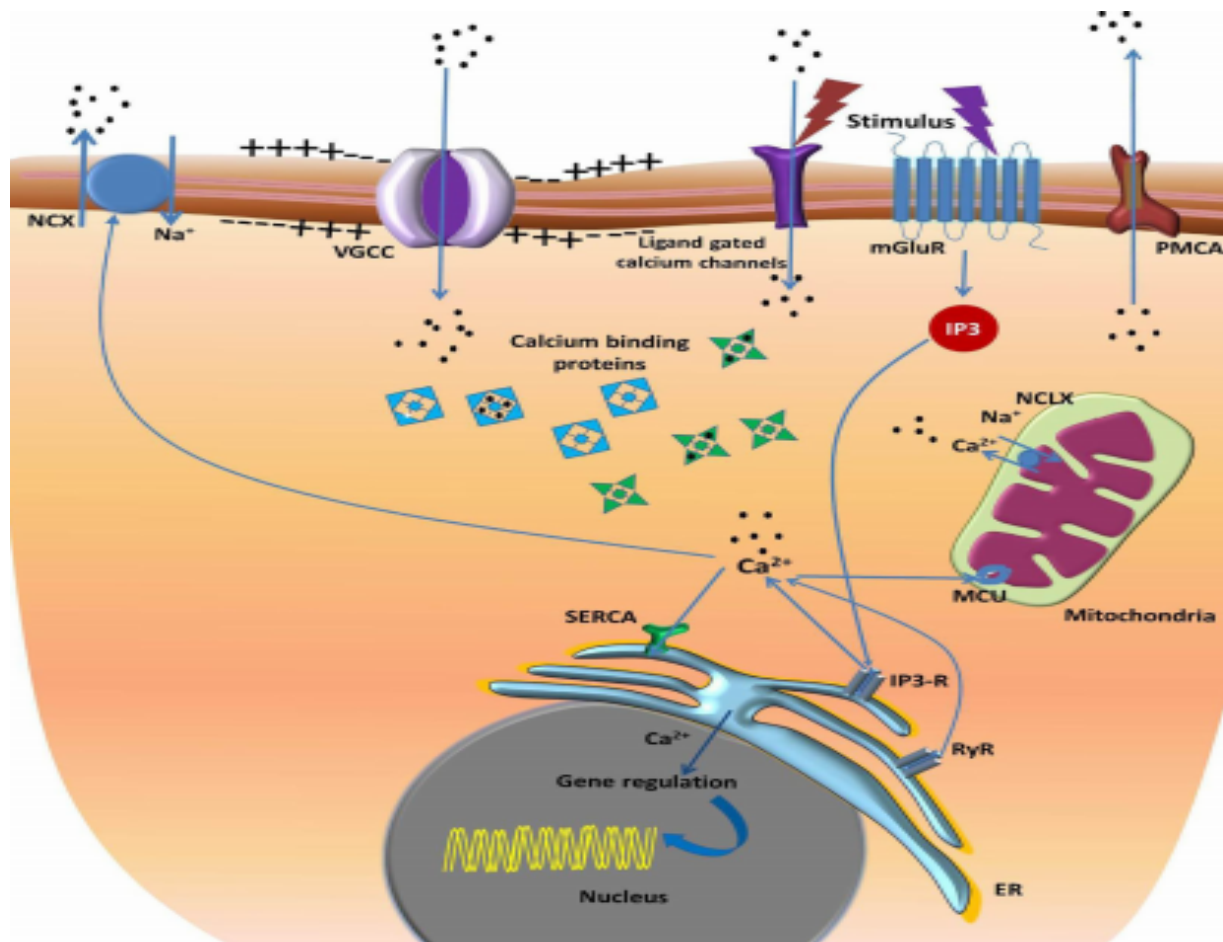


Figure 28. Mécanismes d'homéostasie calcique (Chandran *et al.*, 2019).

3.3.3. Pompes Ca^{2+} -ATPase de la membrane du réticulum sarco/endoplasmique (SERCA)

La pompe Ca^{2+} -ATPase de type P du réticulum sarco/endoplasmique joue un rôle important dans l'élimination du Ca^{2+} cytosolique en excès, rétablissant ainsi ses niveaux basaux. Dans toutes les cellules au repos, les niveaux de Ca^{2+} sont maintenus bas dans le cytosol (~100 nM). L'ion est stocké principalement dans le réticulum endoplasmique (ER) où sa concentration atteint des centaines de micromoles (Clapham, 2007).

3.3.4. Protéines de liaison au Ca^{2+} : protéines tampons et protéines capteurs de Ca^{2+}

Par rapport aux cellules non excitables, les neurones possèdent un répertoire plus diversifié de protéines manipulant le Ca^{2+} dont beaucoup sont spécifiques aux neurones. Leur tâche consiste à contrôler étroitement les niveaux de calcium cellulaire dans l'espace et dans le temps afin de permettre un contrôle précis des effecteurs de signalisation de Ca^{2+} , tels que la kinase CaMKII et la phosphatase calcineurine (CaN) (Wegierski et Kuznicki, 2018). Plusieurs protéines de liaison au Ca^{2+} sont exprimées dans le système nerveux. Leur localisation et leur affinité pour ce cation diffèrent selon leur rôle spécifique. Sur le plan fonctionnel, elles

peuvent être divisés en deux groupes : les protéines tampons qui, conjointement avec les mécanismes de clairance du calcium, contrôlent la durée et la propagation de ses signaux, et les protéines capteurs de Ca^{2+} qui traduisent également les changements de concentration en calcium en signaux spécifiques. Parmi ces protéines on peut citer : la calséquestrine, la calréticuline, la calbindine, la calrétinine, la calmoduline et la parvalbumine. Ces protéines sont capables de lier les ions calcium et font donc disparaître le calcium sous sa forme ionique, qui est la forme sous laquelle il agit (**Buyck, 2008**).

3.3.5. Echangeurs d'ions $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrane plasmique (NCX)

Les NCX réalisent l'extrusion de Ca^{2+} en utilisant le gradient électrochimique du Na^+ . Pendant chaque cycle, trois ions de Na^+ entrent dans la cellule et un ion Ca^{2+} est extrudé contre son gradient (**Buyck, 2008**). La vitesse d'échange dépend de la concentration de ces ions de part et d'autre de la membrane (**Philipson et al., 2002**). Les NCX ont une faible affinité pour le Ca^{2+} mais une grande capacité de transport de ce dernier (**Brini et al., 2014**).

3.4. Rôle du signal calcium

3.4.1. Introduction

L'ion Ca^{2+} est un messenger intracellulaire polyvalent. Il fournit une régulation dynamique d'une vaste gamme de processus cellulaires (**Bootman et al., 2012**). Les cellules eucaryotes utilisent le Ca^{2+} comme porteur de signal pour réguler les fonctions communes à chacune d'entre elles, et incluent le contrôle du métabolisme par le processus de phosphorylation et de déphosphorylation enzymatique, les processus de motilité comme ceux impliquant le cytosquelette, la sécrétion de diverses molécules dans le processus d'exocytose, la transcription de nombreux gènes, le processus de mort cellulaire programmée (**Brini et al., 2014**) ainsi que la communication et l'adhésion entre les cellules (**Marambaud et al., 2009**). Il est étroitement associé à de nombreux mécanismes de signalisation cellulaire tels que la régulation de complexes Ca^{2+} /calmoduline qui modulent l'action de nombreuses protéines, le chimiotactisme, la croissance cellulaire, la phototransduction dans les cellules visuelles, la différenciation et le contrôle de la méiose (**Bootman et al., 2012 ; Kanchiswamy et al., 2014**).

3.4.2. Rôle du signal calcium à l'échelle neurologique

Dans le système nerveux, les ions calcium conservent et, peut-être même, étendent leur degré élevé de polyvalence en raison de la morphologie complexe des neurones (**Grienberger et Konnerth, 2012**). Le passage du Ca^{2+} à travers la membrane plasmique et entre les organites

intracellulaires intègre diverses fonctions cellulaires et soutient des processus de signalisation complexes revêtant une importance particulière pour l'activité des cellules neuronales.

Les neurones dépendent des ions calcium pour la régulation de nombreux processus cruciaux tels que la neurogenèse et la viabilité neuronale (**Wegierski et Kuznicki, 2018**). L'ion intervient éventuellement dans la croissance des neurites et dans la synaptogenèse (**Mattson, 2007**).

Les neurotransmetteurs transmettent les signaux depuis le terminal de l'axone d'un neurone à travers la synapse jusqu'au neurone suivant. Ils sont emballés dans des vésicules synaptiques qui fusionnent avec la partie présynaptique de la membrane plasmique, déchargeant leur contenu dans la fente synaptique pour atteindre des récepteurs spécifiques sur la membrane postsynaptique du neurone suivant. Le Ca^{2+} joue un rôle dans le processus de libération des neurotransmetteurs : il pénètre dans le terminal axonal suite à la dépolarisation de la membrane plasmique qui ouvre les VOC. Une fois dans le terminal, il favorise la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique présynaptique (**Brini et al., 2014**).

Le signal calcique aide les neurones à s'adapter aux besoins liés à leur activité, et grâce aux mécanismes de feed-back et de feed-forward, renforce les connexions synaptiques pertinentes, élimine les connexions non pertinentes et évite la surexcitation. De cette manière, le Ca^{2+} joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'excitabilité neuronale (**Gleichmann et Mattson, 2011**).

L'apprentissage, la formation et la consolidation de la mémoire, la potentialisation à long terme (LTP) sont tous des processus neuronaux spécifiques qui sont sous le contrôle de signaux calciques (**Wojda et al., 2008**). La LTP définit l'augmentation durable de la transmission synaptique à la suite d'une stimulation à haute fréquence. Les synapses ont la capacité de modifier leur force, c'est-à-dire qu'elles font preuve de plasticité. Etant donné que l'apprentissage et la mémoire sont généralement liés aux modifications de la force synaptique, on suppose généralement que la LTP est impliquée dans ces processus (**Brini et al., 2014**). Lors de l'activité synaptique, l'augmentation des concentrations de calcium cytosolique initie l'activation de plusieurs cascades de signalisation dépendantes de la kinase, conduisant à l'activation de CREB, essentielle à l'induction et à l'expression de la LTP et à la plasticité synaptique (fig. 29) (**Marambaud et al., 2009**). Selon Hudmon et Schulman (**2002**). Le neurotransmetteur glutamate interagit d'abord avec les AMPAR postsynaptiques, induisant la pénétration de Na^+ dans le neurone postsynaptique. La dépolarisation de cette dernière élimine

le bloc Mg^{2+} des récepteurs NMDA postsynaptiques, permettant ainsi l'influx de Ca^{2+} dans le neurone et l'activation d'un certain nombre de kinases et d'autres enzymes, telles que la NO synthase.

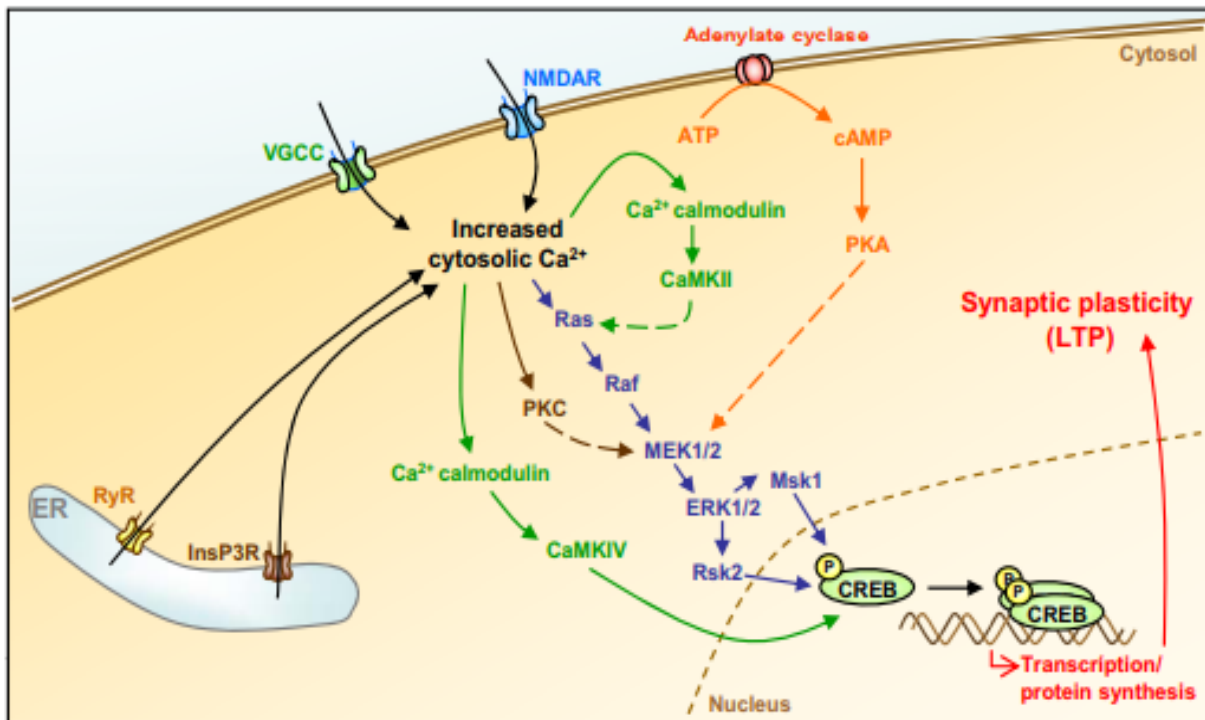


Figure 29. Rôle du signal calcique dans la plasticité synaptique (Marambaud *et al.*, 2009).

Les signaux calcium ont la propriété particulière de l'autorégulation, c'est-à-dire que les systèmes protéiques qui contrôlent l'homéostasie cellulaire du Ca^{2+} peuvent être régulés par le Ca^{2+} lui-même, tant au niveau transcriptionnel que post-transcriptionnel (Mellstrom *et al.*, 2008). D'après Clapham (2007), les capacités des ions Ca^{2+} à modifier les champs électrostatiques locaux et les conformations des protéines sont les deux outils universels de la transduction du signal. La fonction des protéines est régie par la forme et la charge. Le Ca^{2+} en se fixant sur ces protéines déclenche des changements conformationnels.

Dans le noyau, les signaux de calcium peuvent réguler la transcription génique (Lyons et West, 2011 ; Kanchiswamy *et al.*, 2014). Le Ca^{2+} est impliqué dans la dégradation de l'enveloppe nucléaire et dans l'activation de la transcription (Liu *et al.*, 1993). En outre, la phosphorylation du facteur de transcription CREB est induite par le Ca^{2+} , 30 secondes après la dépolarisation cellulaire (Humbert, 1995). Dans le noyau, le Ca^{2+} contrôle l'action de diverses protéases et nucléases, la fonction de la calmoduline nucléaire dans la synthèse de l'ADN, le début et la progression de la mitose, l'expression des gènes et la réparation de l'ADN. Il est aussi

impliqué dans la régulation de la méiose en intervenant dans la dégradation des cyclines par la Ca^{2+} /calmoduline kinase II (**Bachs *et al.*, 1994**).

Le Ca^{2+} régule la capacité des mitochondries à fournir de l'ATP aux processus exigeants en énergie, y compris les pompes assurant son élimination du cytosol. Cependant, le calcium matriciel régule aussi directement la F1F0-ATPase (**Denton, 2009, Zundorf et Reiser, 2011**).

3.5. Dyshoméostasie calcique et la neurodégénérescence

Même de légères variations du niveau de Ca^{2+} sont mortelles pour les neurones. En vieillissant, plusieurs changements se produisent aux niveaux physiologique et moléculaire qui affectent l'homéostasie globale du calcium dans les neurones, ce qui les rend plus susceptibles à la neurodégénérescence (**Chandran *et al.*, 2019**). Selon Zundorf et Reiser (**2011**), la dérégulation du signal Ca^{2+} est décisive pour la dégénérescence et la mort cérébrale après un AVC ischémique, la neurodégénérescence à long terme dans la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, les processus inflammatoires comme la sclérose en plaques, la sclérose épileptique et les leucodystrophies. D'après Wojda *et al.* (**2008**), La dyshoméostasie du Ca^{2+} due à l'infection par les virus HIV ou à des accidents soudains, tels qu'un accident cérébrovasculaire ou une lésion cérébrale traumatique, entraîne une mort neuronale rapide.

La perturbation de l'homéostasie calcique implique plusieurs mécanismes, tels que des altérations des capacités tampon du calcium, une dérégulation de l'activité des canaux calciques ou une excitotoxicité. Différentes populations de neurones sont sélectivement affectées dans les maladies neurodégénératives.

La vulnérabilité sélective de certaines populations neuronales peut être expliquée en partie par la diminution de l'expression de certaines protéines tampons du calcium, notamment la calbindine D28K, la calmoduline et la parvalbumine (**Marambaud *et al.*, 2009**). Il a été suggéré que la diminution de la capacité tampon de SERCA et de la Ca^{2+} -ATPase (PMCA) dans la membrane plasmique entraînerait des modifications du transport du Ca^{2+} , conduisant à une augmentation prolongée du calcium cytosolique. En outre, une diminution de la capacité de rétention du Ca^{2+} mitochondrial pourrait entraîner une altération de l'homéostasie calcique. Des altérations de la libération de Ca^{2+} par les récepteurs RyR sur le RE ont également été associées à la dyshoméostasie associée à la neurodégénération (fig. 30) (**Chandran *et al.*, 2019**).

La dérégulation des canaux calciques est également décrite dans certaines maladies neurodégénératives. Les changements dans le niveau d'expression et l'activité des canaux Ca^{2+} ,

y compris ceux dépendants du voltage (VGCC) ainsi que des récepteurs ionotropes du glutamate avaient également été signalés dans la neurodégénérescence (**Chandran *et al.*, 2019**). Des études avaient démontré que l'auto-immunité pouvait être impliquée dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. La plupart des patients atteints de la forme SLA sporadique de cette pathologie possédaient des immunoglobulines (IgG) dirigées contre les canaux calciques voltage dépendant (VGCC) (**Marambaud *et al.*, 2009**).

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur le plus abondant du système nerveux des mammifères. L'activation excessive des récepteurs du glutamate peut entraîner un dysfonctionnement neuronal et la mort cellulaire, processus appelé excitotoxicité. L'activation incontrôlée des récepteurs ionotropes entraîne un afflux excessif de calcium à travers la membrane plasmique associé à des troubles de l'activation synaptique et de la plasticité neuronale. Il active des enzymes dépendantes du calcium impliquées dans le catabolisme des protéines, des phospholipides et des acides nucléiques ainsi que dans la synthèse de l'oxyde nitrique (NO). Ces altérations peuvent potentiellement conduire à la mort cellulaire par différentes voies, telles que la dégradation de la membrane, les altérations du cytosquelette et la production de radicaux libres dérivés du NO. Une activation accrue des récepteurs du glutamate a été décrite dans AD, PD, ALS et HD (**Abuhamadah, 2014**).

Divers facteurs, notamment les taux élevés de calcium mitochondrial et la dépolarisation mitochondriale, déclenchent l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP). L'ouverture prolongée de ces pores avait été associée à la libération de facteurs apoptotiques et à la mort cellulaire (**Marambaud *et al.*, 2009**).

Au niveau synaptique, l'augmentation locale exaspérée des concentrations de calcium entraîne un certain nombre d'altérations spécifiques à la synapse à court et à long terme. Ceux-ci incluent l'insertion ou le retrait de sous-unités de canaux calciques spécifiques au niveau de la membrane ou à partir de celle-ci ainsi que la modification post traductionnelle ou la dégradation des protéines synaptiques (**Catterall et Few, 2008**).

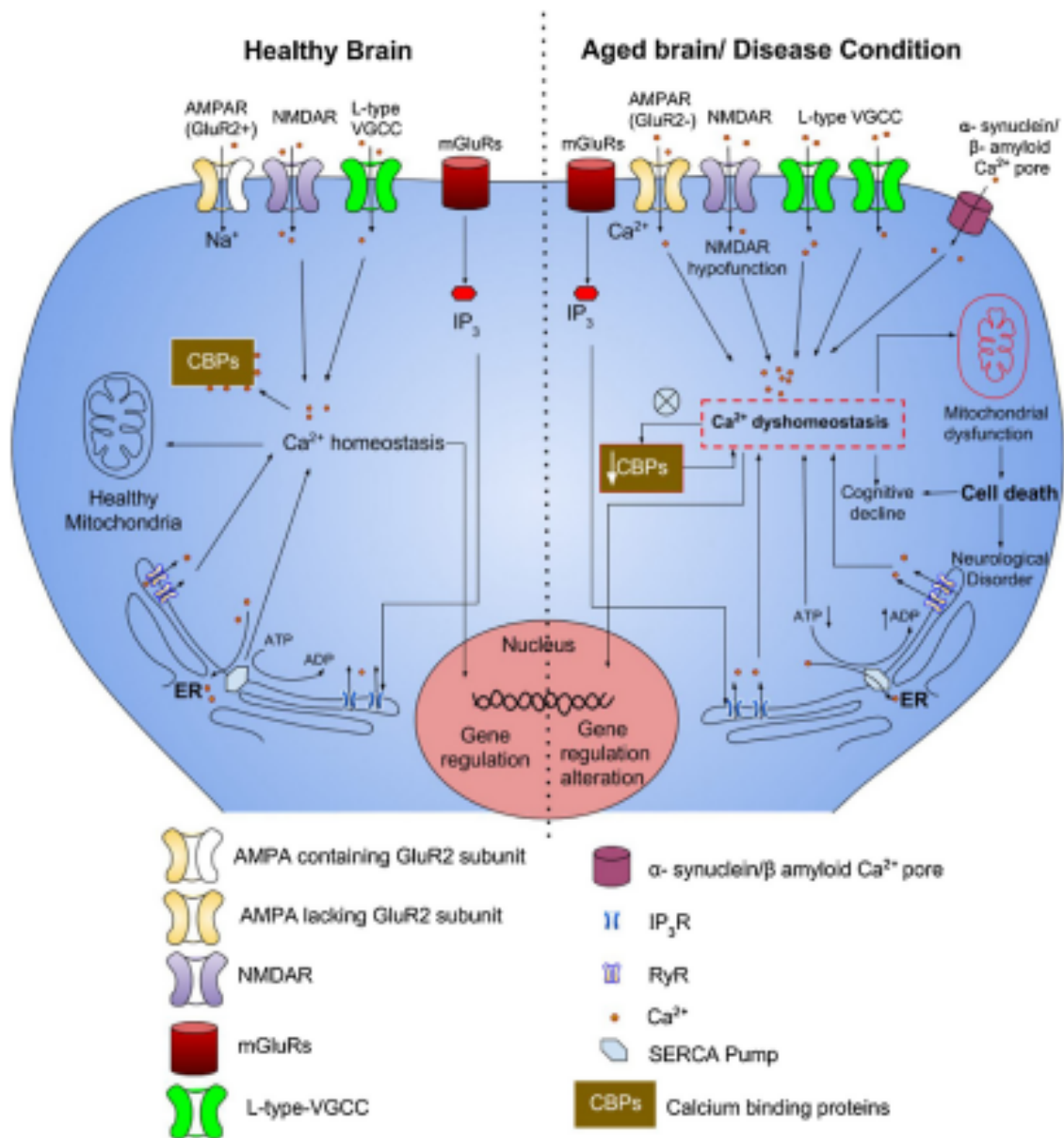


Figure 30. Signal calcique dans un cerveau sain et un cerveau âgé ou en condition pathologique (Chandran *et al.*, 2019).

3.5.1. Signal calcique, le stress oxydatif et la neurodégénérescence

La diminution des habilités des neurones à maintenir les niveaux d'énergie cellulaire et la suppression des ROS peut avoir un impact sur le signal calcium durant le vieillissement et les processus de maladies neurodégénératives (Gleichmann et Mattson, 2011). Les ROS activent les canaux calciques et désactivent les pompes à calcium, ce qui entraîne des taux de calcium intracellulaires anormalement élevés dans les neurones. Cette hausse du Ca²⁺ cytosolique entraînera l'activation des enzymes dépendantes de Ca²⁺, la phospholipase cytosolique A2, la xanthine oxydase et l'oxyde nitrique synthase neuronale (NOS). Cette

activation génère davantage de ROS, d'oxyde nitrique et de peroxy-nitrite, ce qui finit par entraîner des dommages nucléaires, des dommages mitochondriaux, une inhibition du protéasome et un stress du réticulum endoplasmique (**Shibata et Kobayashi, 2008**).

NO et le peroxy-nitrite entravent la S-glutathionylation et la S-nitrosylation de nombreuses protéines, ce qui entraîne davantage de mauvais repliement des protéines (**Nemmiche, 2017**). La SERCA, la PMCA et les NCX sont inhibés par les ROS dans le cœur, le pancréas et le cerveau (**Feissner et al., 2009**). Cependant, certains ROS qui échappent au système antioxydant peuvent activer des voies de signalisation cellulaire impliquées dans diverses fonctions, notamment la survie cellulaire et même la plasticité synaptique (**Watson et al., 2002 ; Kamsler et Segal, 2004**). Les ROS, par oxydation et glutathionylation ultérieure des groupes thiol, modulent également la cinétique des protéines clés du RE et de l'homéostasie du Ca^{2+} mitochondrial, à savoir les récepteurs mPTP, SERCA, IP₃R et les RyR (**Csordas et Hajnoczky, 2009**). Selon Hidalgo (**2005**), les ROS peuvent moduler directement les récepteurs de la ryanodine (RyR) en induisant l'oxydation du NO en ions nitrosium (NO^+) et la réaction subséquente avec des thiols libres dans RyR pour former du S-nitrosothiol, qui stimule la libération de Ca^{2+} à partir du réticulum endoplasmique.

Les composantes de l'homéostasie ROS sont régulées par des voies dépendant de Ca^{2+} et un afflux élevé de Ca^{2+} peut conduire à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) mitochondriales. Pour les mitochondries neuronales, les dommages oxydatifs signifient une production moins efficace d'ATP, de NADH et une capacité respiratoire maximale réduite (**Gleichmann et Mattson, 2011**). Dong *et al.* (**2017**), rapportent que l'environnement rédox module l'activité de l'uniporteur calcium mitochondrial (MCU), un canal hautement sélectif du Ca^{2+} et d'une capacité de transport remarquable. Lors de l'oxydation, un résidu de cystéine (Cys) dans le MCU est S-glutathionylé, ce qui favorise l'assemblage des canaux MCU en molécules plus complexes avec une activité persistante, ceci entraînera une absorption accrue de Ca^{2+} par la mitochondrie. L'absorption soutenue de Ca^{2+} , à son tour, augmente la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les mitochondries, provoquant ainsi un cercle vicieux conduisant à une surcharge en Ca^{2+} mitochondriale et à la mort cellulaire (fig. 31) (**Demaurex et Rosselin, 2017**).

Le stress oxydatif, en favorisant la surcharge des mitochondries en Ca^{2+} , induit l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP), conduisant à la libération de protéines pro-apoptotiques mitochondriales dans le cytosol qui initient la voie intrinsèque de mort cellulaire (**De Stefani et al., 2016 ; Demaurex et Rosselin, 2017**).

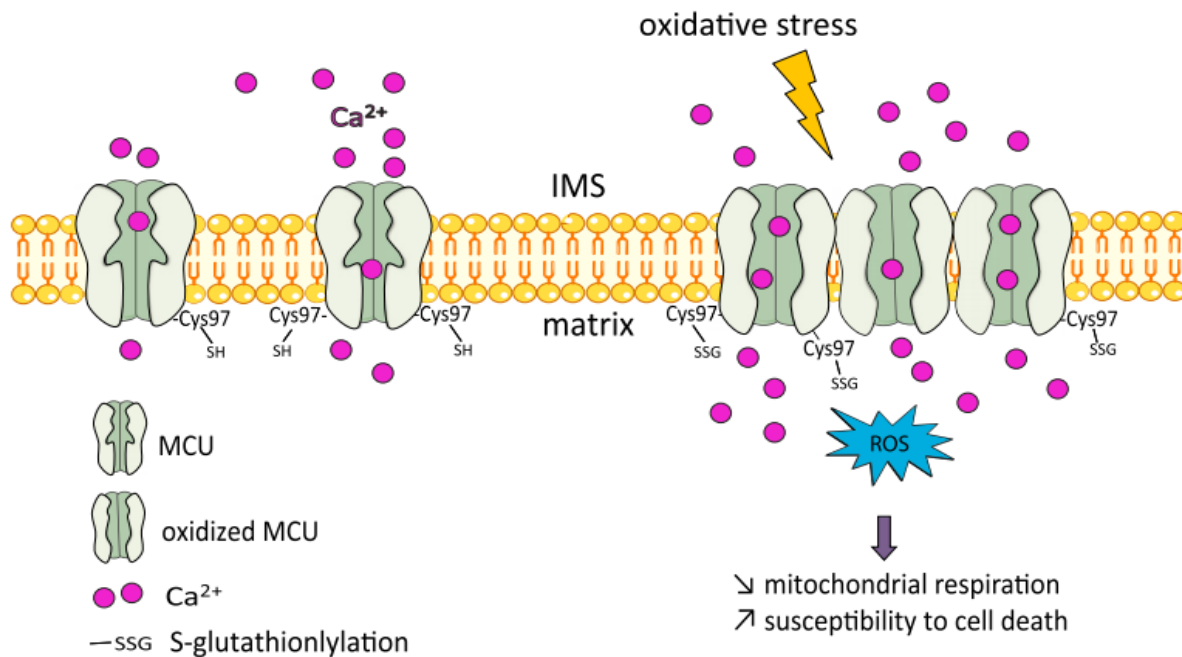


Figure 31. Oxydation de Cys97 active le Ca²⁺ uniporteur mitochondrial (**Demaurex et Rosselin, 2017**).

3.5.2. Quelques exemples de maladies neurodégénératives liées à la dys-homéostasie calcique

L'augmentation du métabolisme de la protéine β -amyloïde est généralement considérée comme le principal mécanisme de la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Cependant, la découverte du modulateur de l'homéostasie du Ca²⁺ (CALHM1) qui module le canal ionique voltage-dépendant (VGCC), favorisant ainsi l'entrée de Ca²⁺ à partir du milieu extracellulaire, pourrait réguler le métabolisme de l'amyloïde (**Dreses-Werringloer et al. 2008**). Il a été montré que les concentrations nano-molaires du peptide β -amyloïde régulent positivement les IP₃R et augmentent le nombre de points de contact réticulum endoplasmique-mitochondries et la concentration mitochondriale en Ca²⁺. Ceci suggère le rôle de ce contact dans la physiopathologie de la maladie (**Hedskog et al., 2013**).

L'implication possible de Ca²⁺ dans la maladie de Parkinson provient de l'observation d'une corrélation négative entre l'expression de la protéine tampon de cet ion (CB-D28k) avec la vulnérabilité des neurones (**Damier et al., 1999**) et que la concentration du calcium cytoplasmique était plus élevée dans les neurones dopaminergiques (**Mosharov et al., 2009**).

Des études sur des modèles cellulaires sur-exprimant les protéines apparentées à la maladie de Parkinson avaient indiqué la possibilité qu'elles puissent être impliquées dans la modulation des signaux Ca^{2+} . L' α -synucléine, la parkine et la DJ-1 amélioreraient le transfert du Ca^{2+} entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie en augmentant le lien entre les deux organites. Cette communication privilégiée était nécessaire pour garantir la physiologie et la morphologie de cette organelle (fig. 32) (Ottolini *et al.*, 2013 ; Melachroinou *et al.*, 2013 ; Brini *et al.*, 2014).

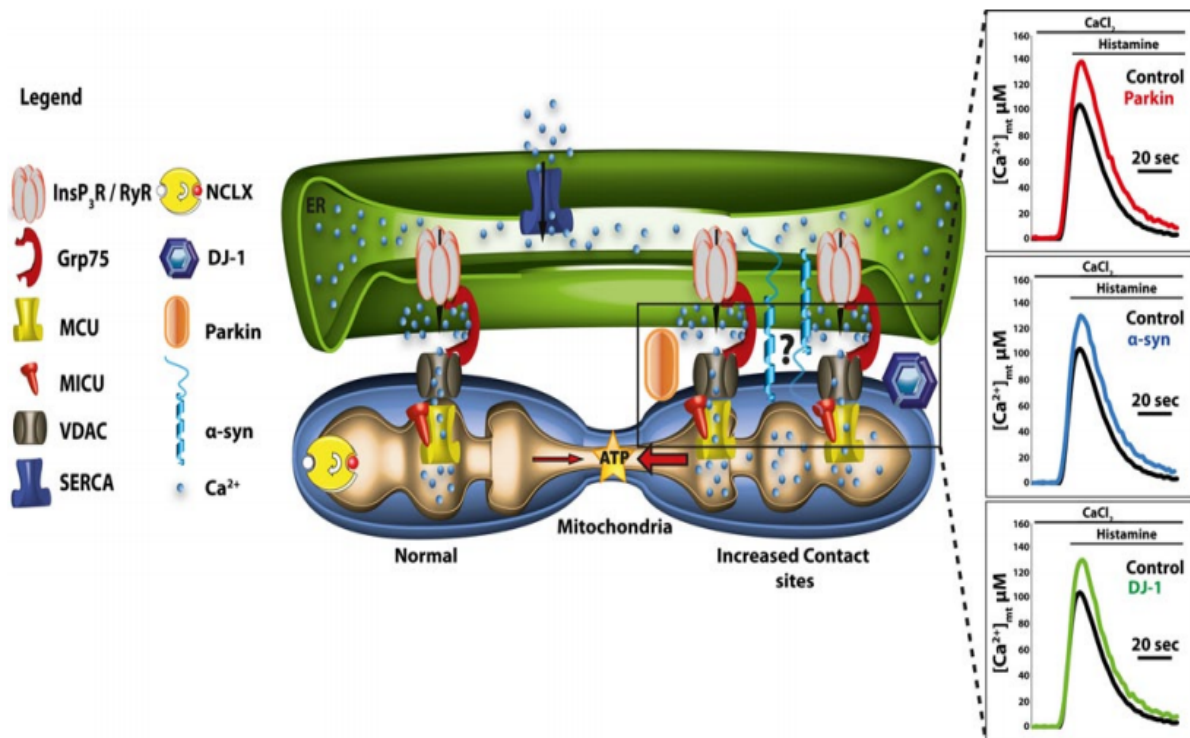


Figure 32. Trois protéines liées à la maladie de Parkinson (α -synucléine, la parkine et la DJ-1) contrôlant l'absorption du Ca^{2+} mitochondrial par la modulation des sites de contact RE-mitochondries (Brini *et al.*, 2014).

Dans des conditions pathologiques telles que l'épilepsie et l'ischémie cérébrale, il se produit une libération massive de glutamate, entraînant une neuro-toxicité au glutamate par le biais de multiples voies, dont des surcharges massives en Ca^{2+} (Arundine et Tymianski, 2003).

3.6. Effets de quelques substances phytochimiques sur le signal calcique

Les effets neuro-protecteurs des polyphénols sont souvent attribués à leur capacité à moduler les voies de signalisation cellulaire (Bournival *et al.*, 2012). La neuro-protection de l'epigallocatechine gallate (EGCG) se fait par l'inhibition des courants de Ca^{2+} activés par haute tension et les courants entrant induits par NMDA, ainsi que l'élévation de Ca^{2+} par la voie PLC-IP3 (Wang *et al.*, 2011). Les récepteurs couplés à la protéine G (GPCR), impliqués dans la

signalisation neuronale et l'excitabilité membranaire, sont activés par la naringine (flavonoïde glycoside), présentant ainsi un potentiel d'amélioration de la cognition dans la maladie d'Alzheimer (**Yow *et al.*, 2011**). Similairement, la curcumine module un large éventail de canaux ioniques incluant CRAC (Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} channels), Kv (voltage-gated K^+ channel), SK4 (intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel), et la concentration cytoplasmique du Ca^{2+} chez les cellules Jurkat-T (**Shin *et al.*, 2011**). Aussi, la quercétine atténue les lésions ischémiques en contrôlant la dérégulation du calcium et la peroxydation des lipides dans les neurones par les canaux ioniques sensibles aux acides (**Pandey *et al.*, 2011**).

A vertical grey bar is positioned on the left side of the page, starting from the top horizontal line and extending downwards. A thin black horizontal line spans the width of the page, intersecting the vertical bar.

Partie Expérimentale

Chapitre 4

Matériel et méthodes

4.1. Matériel végétal

Les échantillons de *Anacyclus pyrethrum* L. ont été collectés dans la région de Tagdempt à 8 km de la wilaya de Tiaret (Algérie). Le matériel végétal a été identifié et authentifié par le Dr SEKKAL F.Z., département de biologie, faculté de sciences de la nature et de la vie, Université de Mostaganem (Algérie). Un spécimen de référence (*Anacyclus pyrethrum* O-002849) est déposé à l'herbier de l'université d'Oran 1. Les espèces *Artemisia absinthium* L. et *Urtica urens* L. ont été ramassés dans la région d'Achacha (wilaya de Mostaganem). Les plantes ont été identifiées par leurs caractéristiques botaniques macro-microscopiques selon les normes. Un spécimen de référence des échantillons se trouve dans l'herbier du Laboratoire de Botanique de l'Université Oran1. Les plantes étaient soigneusement lavées et séchées à l'air libre et à l'ombre pendant quelques jours.

4.2. Préparation des extraits

4.2.1. Extrait aqueux

Procédé de macération simple. 500 g de chaque plante a été placée dans un ballon à fond rond, pendant 48 heures, contenant 2L d'eau distillée. L'extrait aqueux a été filtré et l'eau a été évaporée sous pression réduite en utilisant un évaporateur rotatif à 60°C.

4.2.2. Extrait méthanolique

100 g de chaque plante ont été placés dans un ballon à fond rond contenant 1L de méthanol. Le mélange a été chauffé, sous agitation, dans un bain marie à 60°C pendant 20 minutes puis le mélange a été filtré. Cette procédure a été répétée trois fois en utilisant le même matériel de départ. Les filtrats ont été combinés et le solvant a été éliminé sous vide à 40°C.

4.3. Détermination de la teneur totale en polyphénols

La teneur en composés phénoliques totaux a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu, basée sur la procédure de Singleton et Rossi (1965), en utilisant de l'acide gallique comme standard. Brièvement, 50 µl d'extraits (1 mg/ml) ont été mélangés avec 450 µl d'eau distillée et 2,5 ml de réactif Folin-Ciocalteu 0,2N. Après 5 minutes, 2 ml de carbonate de sodium saturé (75 g/l) ont été ajoutés. L'absorbance de la solution bleue résultante a été mesurée à 765 nm après incubation à 30°C pendant 1,5 h avec agitation intermittente. Des mesures quantitatives ont été effectuées sur la base d'une courbe d'étalonnage standard de sept points 0, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 mg/ml d'acide gallique. La teneur des polyphénols totaux a été exprimée en µg équivalents acide gallique (GAE) /mg de matière sèche.

4.4. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes de l'extrait a été déterminée par la méthode de Lamaison et Carnet (1990). Une aliquote (1,5 ml) de solution d'échantillon diluée de manière appropriée a été mélangée avec 1,5 ml d' AlCl_3 , $6\text{H}_2\text{O}$ (2%). Le mélange a été soigneusement mélangé et laissé reposer pendant 10 minutes à température ambiante. L'absorbance du mélange a été déterminée à 440 nm par rapport à la quercétine, composé standard pour la quantification de la teneur totale en flavonoïdes. Toutes les valeurs ont été exprimées en microgramme équivalent de quercétine par milligramme d'extrait.

4.5. Détermination de l'activité antioxydante des différents extraits

4.5.1. Activité de piégeage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH)

L'activité antioxydante des extraits a été déterminée en utilisant le piégeage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) qui a un maximum d'absorption UV-vis à 515 nm. En recevant le proton de n'importe quel donneur d'hydrogène, principalement des phénoliques, le radical perd son chromophore violet et devient jaune.

Dans les tubes à essai, 1 ml de DPPH dans de l'éthanol (0,1 mM) a été ajouté à 3 ml de solutions d'extrait, correspondant à la gamme d'extrait de concentration entre 0,03 et 1 mg/ml. Après avoir mélangé les échantillons, les mélanges ont été maintenus dans l'obscurité, à température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance a été mesurée à 517 nm en utilisant un spectrophotomètre UVmini-1240 SHIMADZU et comparée à un témoin sans extrait. L'acide ascorbique a été utilisé comme référence. L'activité antioxydante a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH et calculée à partir de l'équation :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = 100 [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon})/\text{Abs contrôle}].$$

Les valeurs d' IC_{50} , exprimées en mg/ml, ont été déterminées à partir des graphiques tracés du pourcentage d'inhibition du radical en fonction de la concentration des extraits. Ces valeurs sont définies comme étant les concentrations de l'extrait nécessaire pour diminuer de 50% la concentration initiale du radical DPPH.

4.5.2. Estimation du pouvoir réducteur de l'extrait

La capacité antioxydante de l'échantillon a été déterminée en utilisant le test du pouvoir réducteur d'Oyaizu (1986). Le test est simple, rapide et reproductible (Benzie et Strain, 1996).

Il est universel et peut être appliqué aux plantes, aux plasmas et aux extraits organiques et aqueux (Li *et al.*, 2008). La capacité réductrice est généralement associée à la présence de reductones, qui casse la chaîne des radicaux libres en faisant don d'un atome d'hydrogène (Sujith *et al.*, 2011). La présence d'agents réducteurs dans les extraits végétaux provoque la réduction du complexe Fe^{3+} /ferricyanure à la forme ferreuse. Par conséquent, le Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de couleur bleue dans le milieu réactionnel à 700 nm. Différentes concentrations des extraits (0,030 à 1 mg/ml) d'eau distillée ont été mélangées avec 2,5 ml de tampon phosphate (200 mM, pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) (1%). Le mélange a été incubé à 50 C° dans un bain d'eau pendant 20 minutes. 2,5 ml d'acide trichloroacétique (10%) ont été ajoutés au mélange, qui a ensuite été centrifugé à 3000 tr/min pendant 10 minutes. Le surnageant (5 ml) a été mélangée avec 5 ml d'eau distillée et 1 ml de FeCl_3 (0,1%) et l'absorbance a été mesurée à 700 nm. Une absorbance accrue du mélange réactionnel indique un pouvoir réducteur élevé. L'acide ascorbique a été utilisé comme référence.

4.6. Analyse statistique

Toutes les expériences ont été réalisées en triple et l'analyse statistique des données a été réalisée en utilisant le programme StatBox (version 6.40). Une valeur de probabilité de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

4.7. Tests de Neurotoxicité

Afin de connaître s'il y a une présence ou pas d'effet toxique de chacun des six extraits végétaux sur les cellules neuronales CAD, un test de viabilité cellulaire appelé aussi le test du MTT avait été réalisé sur ces cellules.

4.7.1. Cellules CAD

Les lignées de cellules catécholaminergiques du système nerveux central, Cath.a, avaient été obtenues par oncogenèse ciblée chez des souris transgéniques, portant un antigène de type sauvage SV40T sous contrôle transcriptionnel du promoteur tyrosine hydroxylase de rats (Suri *et al.*, 1993). Les cellules Cath.a expriment des propriétés neuronales mais elles avaient perdu la morphologie des neurones.

Les cellules de souris (B6/D2 F1 hybrides) CAD (Cath.-a-differentiated), sont une variante de la lignée cellulaire catécholaminergique Cath.a. Les CAD avaient perdu l'oncogène immortalisant, l'antigène SV40T, et expriment des protéines spécifiques aux neurones et des

protéines des vésicules synaptiques telles que la b-tubuline de classe III, la GAP-43, la SNAP-25 et la synaptotagmine qui ne sont pas exprimées chez leurs ascendants Cath.a. De plus, les cellules CAD expriment la tyrosine hydroxylase, enzymatiquement bioactive, et accumulent la L-DOPA. Bien que les deux lignées expriment la tyrosine hydroxylase biologiquement active, les cellules CAD accumulent de la L-DOPA mais manquent de dopamine, ce qui suggère que l'activité de la L-DOPA décarboxylase, qui convertit la DOPA en dopamine, pourrait être déficiente. Les cellules CAD présentent les caractéristiques biochimiques et morphologiques des neurones primaires et constituent un outil unique pour l'étude de la différenciation neuronale (Qi *et al.*, 1997). Le dépositaire et l'auteur est le Dr D. Chikaraishi, du département de neurobiologie, Bâtiment de recherche 427G Bryan, Centre médical de l'Université Duke, Durham, Caroline du Nord, États-Unis 27710.

Dans les cellules CAD, une différenciation morphologique réversible peut être initiée par élimination du sérum ou de la protéine ajoutée de manière exogène au milieu de culture.

4.7.2. Différenciation et dédifférenciation des cellules CAD

La différenciation morphologique réversible peut être initiée par l'élimination du sérum ou de la protéine exogène ajoutée au milieu de culture. Le premier jour, les cellules commencent à mettre en place des axons. Quatre jours après la mise en culture, la plupart des cellules présentent de longs axons (Qi *et al.*, 1997 ; Abuhamad, 2014) (fig. 33 et 34). Dans ces conditions, les cellules CAD différenciées semblent être en bonne santé malgré le manque de protéines et de sérum dans le milieu. Elles peuvent être maintenues dans cet état pendant au moins 6 semaines, après quoi elles ont tendance à se détacher des flacons de culture sous forme de monocouches après une perturbation mécanique. Le détachement est probablement le résultat d'un manque de substrat approprié plutôt que de la mort des cellules car les feuilles détachées peuvent être triturées et les cellules répliquées sans sérum. En revanche, lorsque les cellules parentales Cath.a, avaient été commutées, en mode sans sérum ni protéines, elles mouraient (Qi *et al.*, 1997). Le fait de priver les cellules CAD de sérum, réduit considérablement leur prolifération alors que l'absence des protéines dans le milieu de culture, stoppe immédiatement l'augmentation de leur nombre.

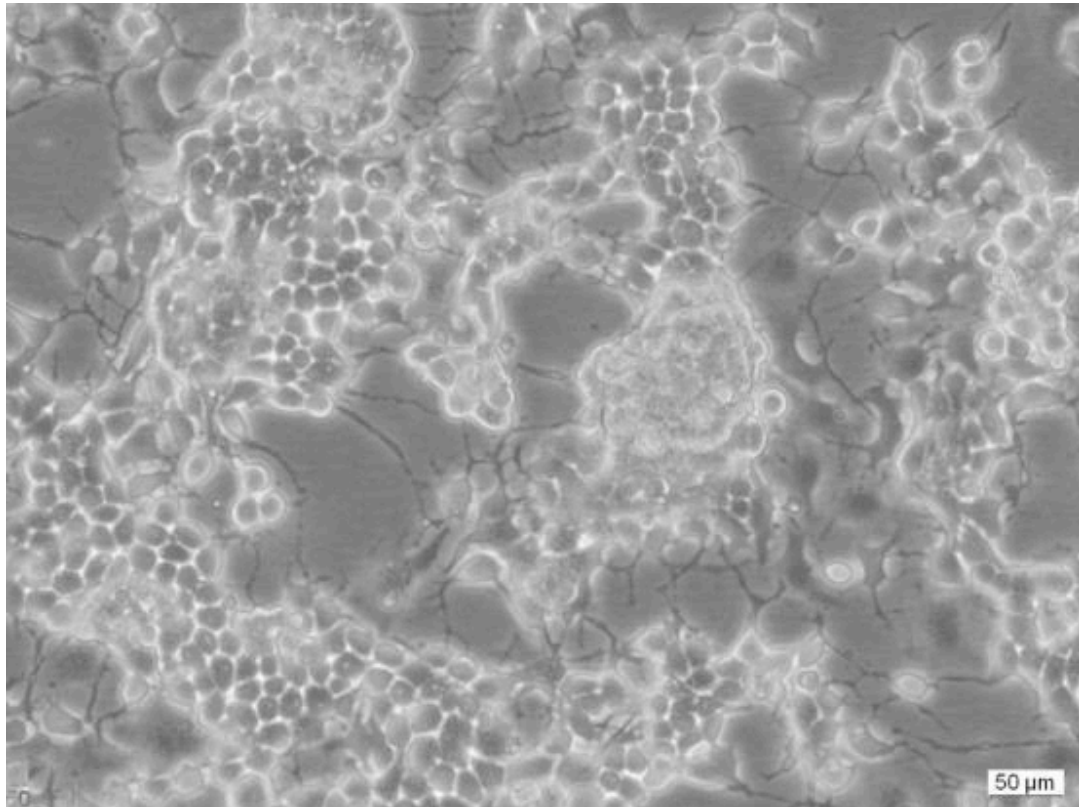


Figure 33. Cellules CAD indifférenciées dans un milieu contenant du sérum. Image de contraste de phase (Abuhamadah, 2014).

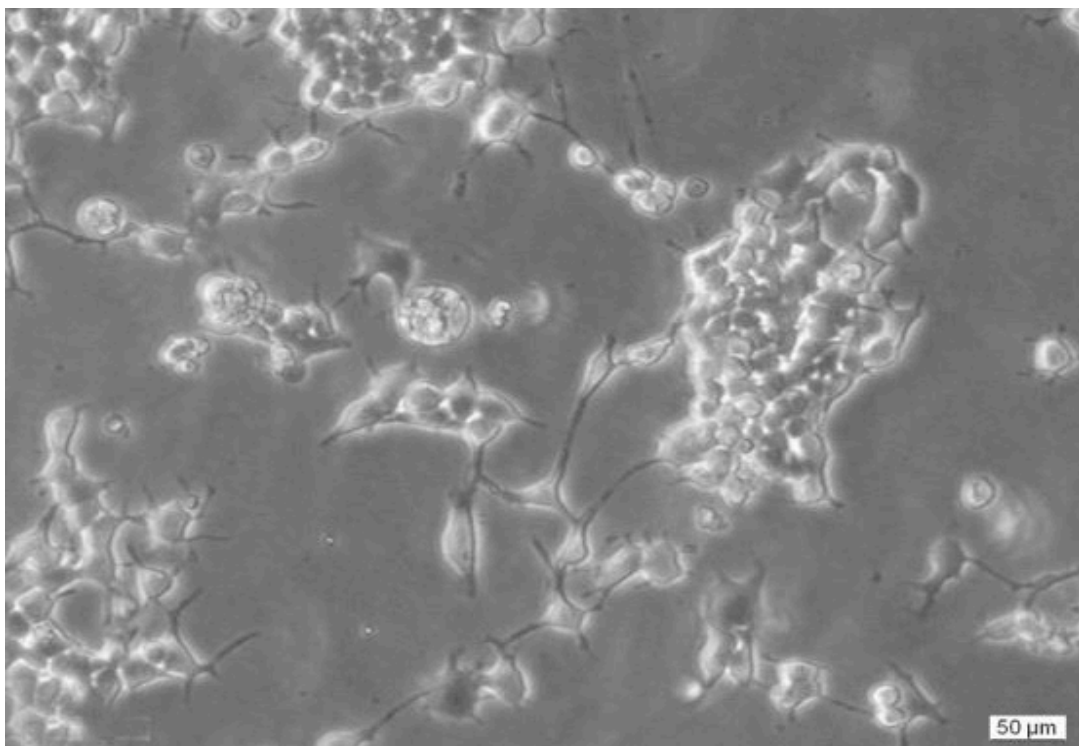


Figure 34. Cellules CAD différenciées dans un milieu sans sérum montrant de longs axones. Image de contraste de phase (Abuhamadah, 2014).

4.7.3. Applications des cellules CAD

Les cellules CAD présentent des caractéristiques biochimiques et morphologiques des neurones primaires et fournissent un outil unique pour l'étude de la différenciation neuronale et l'étude des cellules neuronales indifférenciées.

4.7.4. Culture de cellules CAD

La culture des cellules CAD et les expériences ont été réalisées dans des installations de CLI dans des conditions stériles. Des cellules CAD ont été cultivées à 37°C et à 5% de CO₂ sur des flacons de culture tissulaire de 75 cm² (T75) (Sarstedt, Newton, NC), dans un milieu Dulbecco's modified eagles' medium DMEM/F-12 Media - GlutaMAX™-I (GIBCO, Grand Island, NY), additionné de 10% de sérum fœtal bovin (FBS, Sigma, St. Louis, MO).

Les cellules ont été soumises à un passage tous les 6 à 7 jours à une dilution de 1/4. Les CAD se différencient pour former des axons neuronaux dans des conditions sans sérum. Pour induire une différenciation morphologique, les cellules ont été transférées sur le même milieu sans supplément de sérum après 12-24 h.

4.7.5. Subculture de la lignée cellulaire CAD

Une fois que les cellules CAD deviennent confluentes à 80% à peu près dans les flacons de culture, on jette le milieu de culture d'origine dans des récipients appropriés, puis on rajoute 10 ml de nouveau milieu Dulbecco's modified eagles' medium DMEM/F-12 Media-GlutaMAX™-I additionné de 10% de sérum fœtal bovin dans chaque flacon.

On déloge les cellules, adhérant aux parois des flacons, par un pipetage doux en aspirant et en injectant doucement le milieu de culture, pendant 3 minutes, pour ne pas détruire les cellules. Le contenu de chaque flacon a été récupéré et centrifugé à 1000rpm pendant 5 minutes et le surnageant était par la suite éliminé. 5ml du milieu DMEM avaient été ajouté aux cellules (culot) et c'est à partir de cette suspension que les dilutions désirées pouvaient alors être préparées.

4.7.6. Cryoconservation et stockage de la lignée cellulaire CAD

Les cultures sous-confluentes (70-80%) ont été délogées par pipetage doux ; transféré dans un tube de 15 ml et centrifugé à 200 x g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot a été remis en suspension dans du milieu DMEM® F-12 - GlutaMAX™ -I supplémenté avec 10% de FBS et 10% de DMSO. La suspension cellulaire a été immédiatement divisée et stockée à -80°C pendant 24 heures, puis transférée dans de l'azote liquide.

4.7.7. Ressuscitation de la lignée cellulaire congelée

Le flacon cryogénique de cellules CAD, conservées dans de l'azote liquide, est collecté à l'aide d'un équipement de protection approprié. Le flacon a ensuite été rapidement transféré dans un bain-marie à 37°C. Il est important de décongeler le contenu du flacon rapidement pour minimiser les dommages causés aux membranes cellulaires. L'ampoule a ensuite été nettoyée avec un mouchoir imbibé d'alcool (70%) avant l'ouverture. L'ensemble du contenu de l'ampoule est transféré dans un tube stérile de 15 ml. Du DMEM préchauffé a été ajouté aux cellules CAD pour atteindre un volume total de 10 ml. Le tube a ensuite été centrifugé à 1000 tr/min pendant 5 min. Le surnageant a été retiré et le culot a été remis en suspension dans du milieu DMEM/F-12 - GlutaMAX™ -I supplémenté avec 10% de FBS. Les cellules remises en suspension ont été cultivées à 37°C et 5% de CO₂ dans des flacons de culture tissulaire de 75 cm².

4.7.8. Test de neurotoxicité (essai du MTT ou test de viabilité cellulaire)

L'effet de divers extraits de plantes sur la viabilité des cellules CAD a été déterminé en utilisant le test du MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. Ceci forme un précipité dans la mitochondrie de couleur violette. La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes mais également à l'activité métabolique de chaque cellule viable (**Kang et al., 2005 ; Freshney, 2011**).

Les cultures CAD subconfluentes (70-80%) ont été délogées par un pipetage doux puis transférées dans un tube de 15 ml et centrifugées à 1000 tr/min pendant 5 minutes à 4°C. Le culot a été remis en suspension dans du milieu DMEM/F-12-GlutaMAX™ -I supplémenté avec 10% de FBS et une série de dilutions y a été préparées. Les suspensions cellulaires ont été immédiatement étalées dans des plaques de 24 puits et remises en culture. Une série de dilution (1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 mg/ml) des extraits aqueux et méthanoliques de *Anacyclus perythrum* L., de *Artemisia absinthium* L. et de *Urtica urens* L. avait été préparée en utilisant 10µl de diméthylsulfoxyde (DMSO) et de l'eau distillée comme solvant. Une fois que les cultures cellulaires étaient devenues confluentes à près de 80%, les différentes dilutions de chaque extrait végétal avaient été placées dans des plaques de 24 puits puis incubées à 37°C et à 5% de CO₂. Après 24 heures de traitement, 50 µl de solution tampon de phosphate (PBS), pH 7,4, contenant 5 mg/ml de MTT avaient été ajoutés à chaque puits et incubés à 37°C (5% de CO₂) pendant 2,5 heures. Ensuite, le contenu de chaque puits avait été récupéré et placé dans des tubes Eppendorf puis centrifugé pendant 10 min à 13000 rpm. 250 µl d'isopropanol avaient été

ajoutés au culot pour dissoudre les cristaux violets après les avoir rincé au PBS. La densité optique de 100 µl de chaque échantillon avait été lue par spectrophotométrie à 590 nm (Thermo Lab systems Multiskan Ascent, V1.3). La viabilité cellulaire relative a été déterminée par la quantité de MTT convertie en sel de formazan insoluble. La réduction de l'absorbance de la viabilité des échantillons a été déterminée par la réduction de l'absorbance des échantillons à diverses concentrations par rapport au témoin non traité. La viabilité cellulaire a été calculée en fonction de l'équation suivante : Viabilité% = proportion de l'absorbance de l'échantillon/absorbance du contrôle (Mohammadi *et al.*, 2016).

Toutes les données sont présentées en moyenne ± déviation standard (SD) pour au moins 4 répétitions pour chaque échantillon préparé.

4.8. Test de neuroprotection

Un test de neuroprotection avait été appliqué aux cellules CAD, et avait pour but de connaître si oui ou non, les extraits de plantes sélectionnées pouvaient protéger ces cellules contre un stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène H₂O₂.

Une solution mère de H₂O₂ (2500 µM) dans une solution tampon de phosphate, PH 7.4 (PBS), a été fraîchement préparée. Une série de dilutions a ensuite été préparée en utilisant le milieu Dulbecco's modified eagles' medium DMEM/F-12 Media - GlutaMAX™-I, additionné de 10% de sérum fœtal bovin(FBS) pour atteindre des concentrations finales de 250 µM. Les cultures subconfluentes (70-80%) ont été délogées par un pipetage doux puis transférées dans un tube de 15 ml et centrifugées à 1000 tr/min pendant 5 minutes à 4°C. Le culot a été remis en suspension dans du milieu DMEM/F-12 GlutaMAX™ -I supplémenté avec 10% de FBS. Une série de dilution avait été préparée à partir de ces suspensions cellulaires qui ont été immédiatement étalées dans des plaques de 24 puits et remises en culture. Une fois que les cultures sont devenues confluentes à près de 70%, 50µl de chaque dilution d'extrait ont été ajoutés à chaque puits. Après 24 heures d'incubation, 250 µM d'H₂O₂ (30%), préparé plus tôt, avaient été ajouté aux cellules CAD et mise en culture pendant 2 heures supplémentaire. Après quoi un test MTT avait été effectué. Le choix des concentrations d'extrait a été initialement étudié en appliquant différentes concentrations de l'extrait (0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1 mg/ml) pendant 24 heures à des cultures de cellules CAD.

4.9. Analyse statistique

L'analyse statistique des données a été réalisée en utilisant le programme StatBox. (version 6.4). Une valeur de probabilité $P < 0,05$ avait été considérée comme étant statistiquement significative.

4.10. Essais de l'imagerie du calcium

4.10.1. Méthodologie

Les méthodes d'imagerie du calcium mesurent directement le flux dynamique du calcium dans les neurones et le tissu neuronal. Les conditions idéales d'imagerie des cellules résultaient de la croissance des cellules CAD dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂ pendant 6 jours de différenciation dans un milieu sans sérum. 2 mM de sonde calcique, fura-2 (Calcium Green probe), ont été préparé dans du DMSO et maintenus à -20°C.

Le jour de l'expérience, le stock de sonde a été amené à température ambiante puis dilué dans un tampon physiologique HEPES (N-2-hydroxyéthyl pipérazine-N'-2-éthanesulfonique), contenant 150 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂, 10 mM HEPES, 2 mM de CaCl₂ et 5 mM de KCl, jusqu'à obtention d'une solution à 1 μ M. Les cellules ont été étalées dans des micro-boîtes à fond plat ((brand : 60 μ -Dish, 35 mm, Ibidi GmbH), puis lavées avec 1 ml de tampon physiologique HEPES et incubées pendant 40 minutes en ajoutant 1 ml de ce tampon. La sonde de calcium fura-2 a été injectée dans les cellules, dans l'obscurité totale, parce que la sonde est sensible à la lumière.

Après la période d'incubation, les cellules ont été de nouveau lavées avec le tampon physiologique HEPES et laissées dans ce dernier, à l'abri de la lumière, jusqu'au début de l'expérience. Tous les extraits de plantes appliqués aux cellules CAD au cours des expériences ont été dissous dans du tampon physiologique HEPES sous forme de solutions mères 10 fois plus concentrées que la concentration finale souhaitée pour l'expérience.

Pour l'imagerie, le microscope confocal LSM 880 Airyscan-Zeiss avec une taille 63 œil lens (et un LA de 1,4) a été utilisé pour capturer chaque image. Le temps entre chaque image (série temporelle) a été réglé à zéro avec une durée de 633,02ms (pour chaque image). Le laser était réglé à 514 nM : 1,1% (Ch₂GaAsp : 524-620) - avec une fenêtre spectrale fixée à 24620 et un trou d'épingle de 49 μ m. Les cellules ont été dépolarisées par injection de 50 mM de KCl dans les cellules.

4.10.2. Analyse des donnés

Pour l'analyse des donnés, les corps cellulaires ont été isolés, les régions d'intérêts ayant été identifiées et isolées en sélectionnant leurs superficies correspondantes. Les graphiques de l'intensité de fluorescence divisés par la zone correspondante en fonction du temps, dans les cycles d'imagerie, ont ensuite été tracés. Les chiffres rapportés correspondent à des cellules isolées avec les signaux de base les plus forts, recueillies à partir de $n = 10$ répliques de cellules provenant de trois expériences distinctes.

4.11. Détermination de la composition chimique de *Anacyclus pyrethrum* L. par HPLC-UV-MS/MS

Les extraits aqueux et méthanoliques des racines de *A. pyrethrum* L. ont été soumis à une analyse HPLC-UV-MS/MS.

4.11.1. Appareil HPLC

Les analyses chromatographiques ont été réalisées grâce à un appareil HPLC Thermo Scientific équipé d'une unité "Accela" U-HPLC avec un détecteur à photodiodes UV-Vis et d'un spectromètre de masse "LTQ Orbitrap XL" couplé à une source d'ionisation par électrospray (Thermo Scientific, Waltham, MA, États-Unis).

4.11.2. Phase stationnaire

Les performances de la séparation en chromatographie dépendent de la nature de la phase stationnaire, de sa longueur, de son diamètre et à la taille de ses particules. Dans notre étude la séparation a été effectuée sur une colonne Luna C-18 de 150 mm \times 3 mm, 3 μ m (Phenomenex, Torrance, CA, USA).

4.11.3. Phase mobile

La phase mobile joue un rôle important sur la séparation et affecte l'ionisation des molécules et de ce fait la sensibilité du détecteur. La phase mobile utilisée était constituée d'eau de méthanol CH₃OH et d'acétonitrile CH₃CN⁺¹ ; acidifiés séparément avec 0,075% d'acide formique.

4.11.4. Conditions chromatographiques

La composition de la phase mobile varie dans le temps selon le gradient d'élution suivant : H₂O/CH₃OH/CH₃CN⁺ : 90: 0: 10 (0 min), 90: 0: 10 (5 min), 0: 90: 10 (60 min), 0 : 90: 10 (65 min), 90: 0: 10 (67 min), 90: 0: 10 (70 min) suivi d'un retour aux conditions de démarrage et d'un équilibrage dans les conditions de démarrage pendant 5 min avant la prochaine injection. Le débit était de 400µl/min et le volume d'injection de 5 µl.

La source ESI a été utilisée avec une commutation de polarité et le spectromètre de masse a été réglé pour enregistrer les spectres haute résolution MS1 (résolution 30k) (m/z 125-2000) en mode positif en utilisant les spectres MS-spectres-orbitaux et basse résolution (m/z 125-2000) en mode négatif et spectres MS2 et MS3 dépendant des données dans les deux modes en utilisant le piège à ions linéaire.

Les composés détectés ont été attribués par comparaison des données de masse d'accumulation (sur la base de ppm) et des données MS/MS disponibles, en se référant au système d'affectation des composés publié (**Schymanski *et al.*, 2014**) et en utilisant des spectres de support UV.

Chapitre 5

**Résultats
Et
discussion**

5.1. Détermination de la quantité totale des polyphénols

La détermination de la teneur totale en polyphénols dans les deux extraits de chacune des trois plantes a été réalisée séparément en utilisant la méthode colorimétrique appelée méthode de Folin-Ciocalteu. Les molécules de polyphénols ont la capacité de réduire le réactif de Folin-Ciocalteu, et la réaction peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant le changement de la couleur de la solution d'un jaune intense au bleu.

Plusieurs facteurs peuvent influencer la composition chimique d'une espèce végétale, entre autre l'environnement ou l'habitat de la culture, les méthodes de récolte des plantes, l'âge et la position des feuilles, la variété ou la sous-espèce et les facteurs génétiques (Elliott *et al.*, 2007). La méthode d'extraction, y compris la température et la durée d'extraction, le rapport solvant/solide et le type de solvant utilisé peut également influencer sur le profil chimique signalé pour une espèce particulière (Pinelo *et al.*, 2005). Les extraits aqueux et méthanoliques de *Anacyclus pyrethrum* L., de *Artemisia absinthium* L. et de *Urtica urens* L. ont été analysés pour leurs teneurs en polyphénols. La quantité de polyphénols est rapportée en μg équivalent acide gallique/mg d'extrait végétal (tableau 1).

Tableau 1. Dosage des polyphénols totaux des racines de *A. pyrethrum* L. et des feuilles de *A. absinthium* L. et de *U. urens* (μg d'AGE / mg d'extrait).

Plante	<i>A. pyrethrum</i>	<i>A. absinthium</i> L.	<i>U. urens</i> L.
Extrait méthanolique	33,83 \pm 2,02	16 \pm 6,55	36,66 \pm 5,25
Extrait aqueux	24,83 \pm 1,60	12,33 \pm 5,85	20,66 \pm 3,78

5.2. Détermination de la quantité totale des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes, estimée par la méthode de trichlorure d'aluminium, est rapportée en μg équivalent de quercétine/mg d'extrait végétal (tableau 2).

Tableau 2. Dosage des Flavonoïdes totaux des racines de *A. pyrethrum* L. et des feuilles de *A. absinthium* et de *U. urens* L. (en μg équivalent de quercétine/mg d'extrait végétal).

Plantes	<i>A. pyrethrum</i> L.	<i>A. absinthium</i> L.	<i>U. urens</i> L.
Extrait méthanolique	0,84 \pm 0,00	1,07 \pm 0,018	28,91 \pm 2,34
Extrait aqueux	1,40 \pm 0,02	0,49 \pm 0,088	5,61 \pm 0,20

La teneur totale en polyphénols obtenue, résumé dans le tableau1, varie en fonction du type de solvant utilisé. En fait, le méthanol semble être le solvant le plus approprié pour l'extraction des polyphénols. Selon Falleh *et al.* (2008), la solubilité des polyphénols est conditionnée par le type de solvant utilisé; pour une haute récupération de polyphénols, le méthanol est le solvant approprié.

La quantité des composés phénoliques totaux est plus élevée ($33,83 \pm 2,02 \mu\text{g}$ d'AGE/mg d'extrait) dans l'extrait méthanolique que dans l'extrait aqueux ($24,83 \pm 1,60 \mu\text{g}$ d'AGE/mg d'extrait) des racines de *A. pyrethrum* L. ($p < 0.05$). Daoudi *et al.* (2017) rapportent la quantité de $97,57 \mu\text{g}$ AGE/mg d'extrait aqueux dans les racines de pyrèthre. Alors que Kalim *et al.* (2010) ont trouvé la quantité de $62.89 \pm 0.43 \mu\text{g}$ AGE/mg d'extrait hydroalcoolique de *A. pyrethrum* L. Cherrat *et al.* (2017) rapportent $7.83 \pm 1.18 \mu\text{g}$ AGE/mg d'extrait méthanolique et $5.88 \pm 0.63 \mu\text{g}$ AGE/mg d'extrait aqueux de pyrèthre. La teneur la plus élevée en composés phénoliques totaux a été trouvée dans l'extrait méthanolique ($310,78 \text{ mg AGE /g d'extrait}$) suivie par l'extrait aqueux ($183,82 \text{ mg AGE/g d'extrait}$) du pyrèthre de la wilaya de Tlemcen d'après Selles *et al.* (2012). Sujith *et al.* (2011) avaient enregistré $159,63 \text{ mg AGE /g d'extrait}$ éthanolique de racines de *A. pyrethrum* L.

La polarité du solvant ne semblait pas avoir d'incidence sur l'extraction car le solvant le plus polaire (l'eau) avait montré la capacité d'extraction la plus faible pour les polyphénols chez les trois espèces. Il existe une forte corrélation entre les polyphénols et le pouvoir antioxydant, ce qui est démontré chez de nombreuses plantes (Oktay *et al.*, 2003). Ces composés sont connus pour agir comme antioxydants non seulement en raison de leur capacité à donner de l'hydrogène ou des électrons, mais aussi parce qu'ils forment des radicaux intermédiaires stables.

Au cours de la dernière décennie, de nombreux travaux de recherche avaient montré que les polyphénols pouvaient exercer une action particulièrement puissante sur la cognition des mammifères et inverser les pertes de mémoire et d'apprentissages liés à l'âge. En outre, de plus en plus de preuves indiquent également que les polyphénols peuvent inhiber le développement d'une pathologie de type maladie d'Alzheimer et de contrecarrer le déclin cognitif lié à l'âge, probablement par leur capacité à interagir avec l'architecture cellulaire et moléculaire du cerveau responsable de la mémoire (Vauzour, 2012). Wang *et al.* (2012), avaient montré qu'après administration orale de l'épicatéchine, on a pu améliorer la fonction cognitive chez des souris transgéniques (Tg2576) atteintes de la maladie d'Alzheimer par des mécanismes associés aux signalisations CREB (cAMP response element-binding protein).

Les polyphénols induisent des effets bénéfiques sur le système vasculaire périphérique et cérébral entraînant des modifications du débit sanguin cérébrovasculaire. De tels changements sont susceptibles d'induire une angiogenèse, la croissance de nouvelles cellules nerveuses dans l'hippocampe et une modification de la morphologie neuronale (**Rodriguez-Mateos et al., 2014**). Tous ces processus sont connus pour jouer un rôle important dans le maintien de la fonction neuronale et des performances neurocognitives optimales. On pense que la mort des neurones nigraux dans la maladie de Parkinson implique la formation de la neurotoxine endogène, la 5-S cystéinyl-dopamine. Les catéchines et l'acide caféique inhibent la formation de la 5-S-cystéinyl-dopamine induite par la tyrosinase via leur capacité à subir une oxydation par la tyrosinase pour générer des cystéinyl-polyphénols (**Vauzour et al., 2007**).

La quantité des flavonoïdes semble être très hautement significative dans l'extrait aqueux ($1,40 \pm 0,02 \mu\text{g QE/mg}$ d'extrait) par rapport à l'extrait méthanolique des racines de *A. pyrethrum* L. ($0,84 \pm 0,00 \mu\text{g QE/mg}$ d'extrait) ($p < 0.001$) (tableau 2). Cherrat *et al.* (**2017**) ont enregistré la valeur de $0.96 \mu\text{g QE/mg}$ d'extrait hydro-méthanolique contre seulement $0.31 \mu\text{g QE/mg}$ dans la fraction aqueuse. Selon Selles *et al.* (**2012**), les extraits méthanoliques et aqueux de racines de pyrèthre avaient des niveaux plus élevés en flavonoïdes avec respectivement $92,50$ et $72,50 \text{ mg de QE/g}$ d'extrait. Sujith *et al.* (**2011**) ont enregistré la valeur de 29.65 mg QE/g d'extrait éthanolique. De nombreuses espèces de *Anacyclus* comme *A. pyrethrum* L., *A. radiatus* L., *A. valentinus* L., *A. cyrtolepodioide* L. et *A. Clavatus* L. sont utilisées en médecine traditionnelle. D'après plusieurs auteurs, leurs propriétés médicinales sont dues à la présence de flavonoïdes et de terpénoïdes (**Efraim et Zohar, 2008 ; Benitez et al., 2010**). La prise de flavan 3-ols, de théaflavines, de flavonols avait été associée positivement au langage et à la mémoire verbale, en particulier à la mémoire épisodique évaluée par le test RI-48 (**Kesse-Guyot et al., 2012**).

Les quantités des polyphénols des extraits de feuilles de *Artemisia absinthium* L. ne révèlent pas des différences significatives ($p > 0.05$) entre l'extrait aqueux ($12,33 \pm 5,85 \mu\text{g AGE/mg}$ d'extrait) ou bien méthanolique ($16 \pm 6,55 \mu\text{g AGE/mg}$ d'extrait) (tableau 1). Canadanovic-Brunet *et al.* (**2005**) ont signalé que la quantité totale des composés phénoliques dans cette espèce trouvée dans plusieurs extraits obtenus par une procédure d'extraction successive était de $25.6 \mu\text{g AGE/mg}$ d'extrait. Singh *et al.* (**2012**), avaient trouvé 40 mg GAE/g d'extrait aqueux et $43.04 \pm 0.57 \text{ mg GAE/g}$ d'extrait éthanolique d'absinthe. Cependant, une teneur en polyphénols totaux de $9,79 \pm 0.5 \mu\text{g d'AGE/g}$ d'extrait méthanolique d'absinthe a été déterminée par Sengul *et al.* (**2011**). Les valeurs de $1,34 \pm 0.016 \text{ mg AGE/g}$ d'extrait aqueux et $1,31 \pm 0.011 \text{ mg AGE/g}$ d'extrait méthanolique d'absinthe ont été trouvés par Lee *et al.* (**2013**).

Bora et Sharma (2010) enregistraient 122 ± 0.91 mg AGE/g d'extrait de méthanol. Craciunescu *et al.* (2012) rapportent 178.76 ± 1.58 mg CAE/g d'extrait éthanolique d'absinthe. Mahmoudi *et al.* (2009) obtenaient 194.9 ± 9.7 mg AGE/g d'extrait méthanolique des feuilles de cette espèce.

Les composés phénoliques présents dans *A. absinthium* L. sont la fisétine, l'isorhamnétine et le kaempférol (Ivanescu, 2010). Les acides phénoliques tels que les acides chlorogénique, syringique, coumarique, salicylique et vanillique sont également présent dans cette drogue (Craciunescu *et al.*, 2012). Par ailleurs, les flavonoïdes dans l'extrait méthanolique de *A. absinthium* L. avaient été plus abondantes ($1,07 \pm 0,018$ µg QE/mg d'extrait) en comparaison avec l'extrait aqueux ($0,49 \pm 0,088$ µg QE/mg d'extrait) ($p < 0.001$) (tableau 2). Lee *et al.* (2013) avaient obtenu 0.41 ± 0.04 µg QE/mg d'extrait au méthanol et 0.18 ± 0.01 µg QE/mg d'extrait à l'eau des feuilles d'absinthe. Mahmoudi *et al.* (2009) enregistraient 12.4 ± 0.6 mg QE/g d'extrait méthanolique. Bora et Sharma (2010) détectaient 25 ± 0.74 mg RE/g d'extrait méthanolique d'absinthe. Craciunescu *et al.* (2012) avaient enregistré 52.43 ± 2.22 mg QE/g d'extrait éthanolique de feuilles d'absinthe. Les quantités de 550.53 ± 45.93 et de 1108.15 ± 48.78 mgQE/g d'extraits aqueux et éthanolique de *A. absinthium* L. avait été avancées par Singh *et al.* (2012). Les flavonoïdes détectés dans les extraits méthanoliques d'absinthe sont la quercétine et la rutine. Les données chromatographiques HPLC avaient montré la présence d'autres flavonoïdes glycosides telles que l'isoquercitrine, la quercitine-3-O-β-D-glucoside, la quercitine-3-O-rhamnoglucoside, l'isorhamnetine-3-O-rhamnoglucoside et l'isorhamnetine-3-glucoside (Craciunescu *et al.*, 2012).

L'analyse phytochimique de la teneur totale en composés phénoliques exprimée en équivalents d'acide gallique pour les extraits de *U. urens* L. a donnée les résultats suivants : l'extrait aqueux des feuilles de *U. urens* L. semblait contenir une quantité de polyphénols qui avoisine les $20,66 \pm 3,78$ µg AGE/mg d'extrait, alors que celle présente dans l'extrait méthanolique était de $36,66 \pm 5,25$ µg AGE/mg d'extrait ($p < 0.05$) (tableau 1). Mzid *et al.* (2017) ont obtenu 29.56 ± 1.5631 µg AGE /mg d'extrait aqueux et 31.41 ± 0.31 µg AGE /mg d'extrait éthanolique d'ortie. Manu Kumar *et al.* (2013) avaient enregistré les valeurs suivantes : 15.56 ± 0.22 µg AGE/mg d'extrait méthanolique et 4.13 ± 0.03 µg AGE/mg d'extrait aqueux. Marrassini *et al.* (2010) ont trouvé la teneur de 10,4 mg AGE/g d'extrait éthanolique des feuilles d'ortie. L'acide chlorogénique était le composé phénolique le plus abondant dans cet extrait (670 mg/100 g de poids sec).

Des propriétés bénéfiques telles que des activités antioxydantes, hypoglycémiques, antivirales, hépatoprotectrices, anti-inflammatoires et analgésiques ont été attribuées à l'acide chlorogénique (**Alonso-Castro et al., 2008**). L'acide chlorogénique supprimait l'expression de la cyclooxygénase-2 induite par les lipopolysaccharides dans les cellules RAW (**Shan et al., 2009**). Une quantité de $43,915 \pm 19,95$ mg AGE/g d'extrait aqueux de *U. urens* contre $88,75 \pm 12,25$ mg d'AGE/g d'extrait méthanolique de cette plante, telles sont les valeurs obtenues par **Maaroufi et al. (2017)**. **Daoudi et al. (2015)** ont trouvé les valeurs de $0,06 \pm 0,029$ mg AGE/30g d'extrait méthanolique et de $0,098 \pm 0,002$ mg AGE/30g d'extrait aqueux. *U. urens* L. présentait la teneur de 0,8g AGE/100g d'extrait hydroéthanolique, les acides hydroxycinnamiques étant quantifiés dans cet extrait ($0,66$ g/100 g) (**Carvalho et al., 2017**). Selon **Maaroufi et al., (2017)** l'urticaceae est l'une des sources importantes de polyphénols. Les polyphénols détectés dans cette plante par **Nencu et al. (2015)** et **Carvalho et al. (2017)** sont les acides phénolcarboxyliques, l'acide caféoylmalique, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide ellagique. L'effet bénéfique de cette espèce sur la santé humaine est déjà très largement connu (**Fattahi et al., 2014**).

Par ailleurs, les flavonoïdes avaient été assez abondantes dans l'extrait méthanolique de *U. urens* avec des concentrations qui avoisinent les $28,91 \pm 2,34$ µg QE/mg d'extrait alors que dans l'extrait aqueux cette concentration ne dépassait pas les $5,61 \pm 0,20$ µg QE/mg d'extrait ($p < 0.001$) (tableau 2). 6.81 ± 1.72 µg QE/mg d'extrait éthanolique et 5.34 ± 0.21 µg QE/mg d'extrait aqueux étaient les valeurs obtenues par **Mzid et al. (2017)**. **Maaroufi et al. (2017)** ont trouvé une valeur de $67,5 \pm 13,5$ µg QE/g d'extrait méthanolique de *U. urens* L. et de $46 \pm 5,9$ µg QE/g d'extrait aqueux. **Daoudi et al. (2015)** ont enregistré la valeur de $0,005 \pm 0,0002$ mg QE/30 g dans l'extrait alcoolique et de $0,03 \pm 0,005$ mg QE/30 g d'extrait aqueux des feuilles de cette espèce. **Jimoh et al. (2010)** ont obtenu 0.46 ± 0.02 mg QE/g d'extrait méthanolique des feuilles d'*U. urens* L. et 0.36 ± 0.03 mg QE/g d'extrait aqueux. **Manu Kumar et al. (2013)** ont détecté 0.59 ± 0.00 mg QE/g d'extrait méthanolique et 0.58 ± 0.01 mg QE/g d'extrait à l'eau. Les flavonoïdes trouvés dans cette espèce sont la patulétine, la rutine, le kaempférol, la quercétine et l'isorhamnetine (**European Scientific Cooperative of Phytotherapie, 2003**). Quinze différents flavonoïdes dérivés de l'acide hydroxycinnamique et seize flavonoïdes, flavones et glycosides de type flavonols ont été identifiés dans des extraits hydroalcooliques de parties aériennes de *U. urens* L. en utilisant l'HPLC-PDA-ESI / MS. Parmi eux, deux isomères de l'acide p-coumaroyl-caféoylquinique et trois dérivés de 3-hydroxy-3-méthylglutaroyl

flavone analogues à des statines ont été identifiés pour la première fois chez *U. urens* L. (Carvalho *et al.*, 2017).

D'après Slemmer et Weber (2014) les phénols sont des constituants végétaux très importants en raison de leur capacité de piégeage due à leurs groupes hydroxyles. L'efficacité de beaucoup de ces composés provient de leur structure, les composés antioxydants ont souvent des similitudes structurelles qui leur permettent de piéger les électrons en excès des composés oxydants. De manière intéressante, ces composés eux-mêmes sont susceptibles d'être oxydés, et nécessitent donc leurs propres voies de neutralisation. La présence de composés phénoliques permet aux plantes d'agir comme agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et extincteurs d'oxygène singulet (Fattahi *et al.*, 2014).

5.3. Détermination de l'activité antioxydante des différents extraits

5.3.1. Activité du piégeage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH)

L'activité de piégeage des radicaux libres des extraits méthanoliques et aqueux de *Anacyclus pyrethrum* L., de *Artemisia absinthium* L. et de *Urtica urens* L. avait été évaluée à l'aide de la méthode du DPPH. La possibilité que les extraits pouvaient donner de l'hydrogène ou des électrons avait été mesurée en utilisant le radical stable 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) (Manouze *et al.*, 2017). Le DPPH est un radical libre en mesure d'accepter un électron ou un radical hydrogène pour devenir une molécule diamagnétique stable (Maaroufi *et al.*, 2017). La réduction des radicaux DPPH due à la capacité de piégeage de l'extrait peut être observée par la diminution de l'absorbance de ce radical à 517 nm. Les concentrations ayant conduit à une inhibition de 50% (IC₅₀) de ce radical sont présentées dans le tableau 2. Il convient de noter que les valeurs basses des IC₅₀ reflètent une meilleure activité anti-radicalaire. L'acide ascorbique avait été utilisé comme un témoin positif (fig.37).

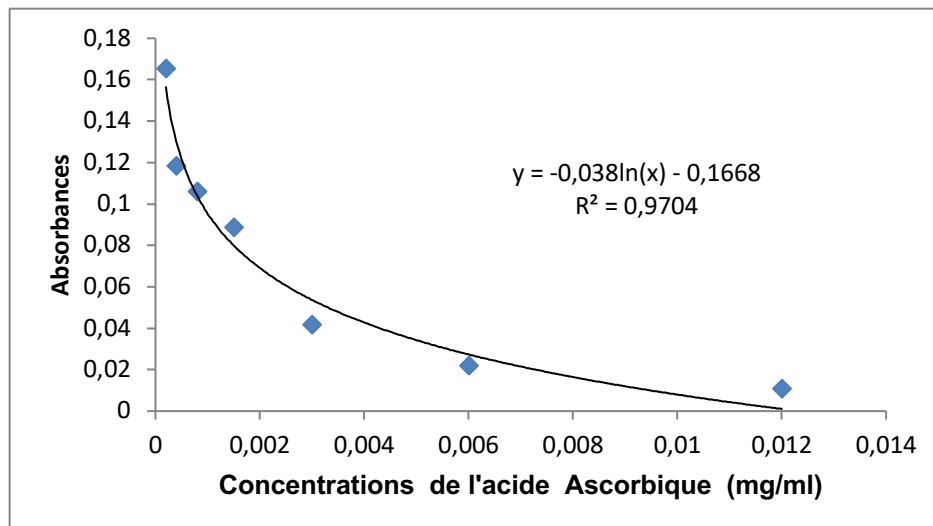


Figure 37. Activité de piégeage du radical DPPH par l'acide ascorbique.

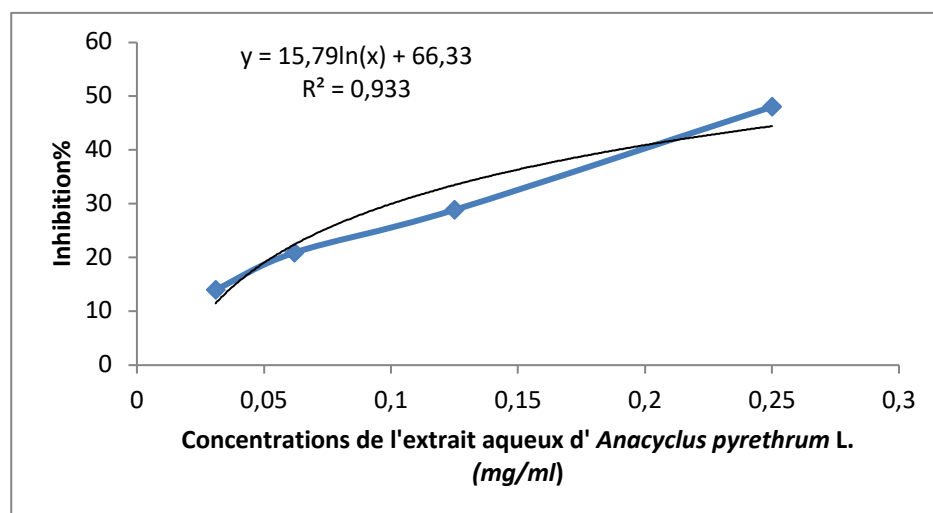


Figure 38. Activité de piégeage de l'extrait aqueux de *Anacyclus pyrethrum* L. sur le radical DPPH.

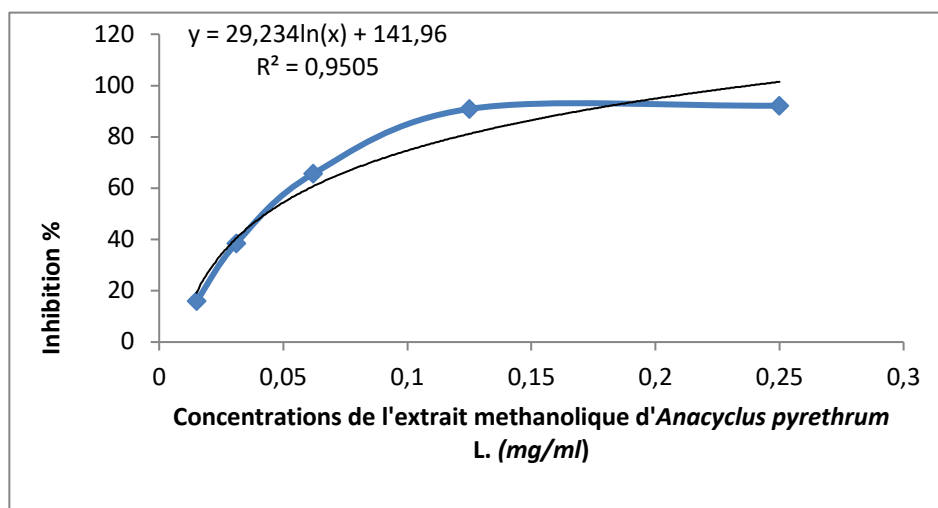


Figure 39. Activité de piégeage de l'extrait méthanolique de *Anacyclus pyrethrum* L. sur le radical DPPH.

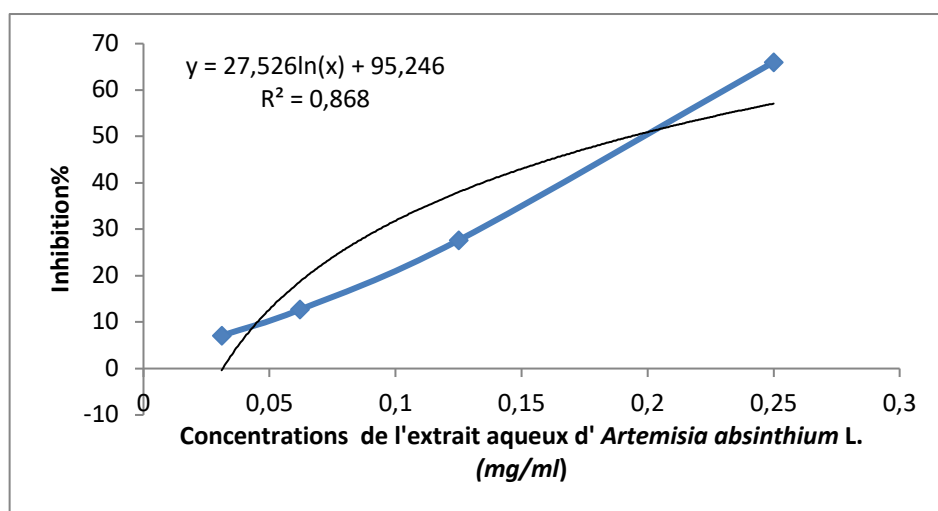


Figure 40. Activité de piégeage du radical DPPH par l'extrait aqueux de *Artemisia absinthium* L.

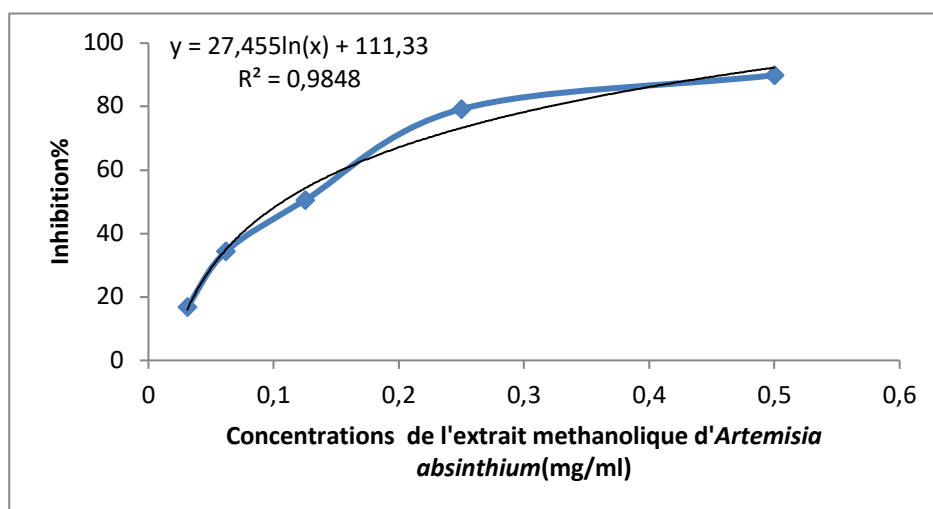


Figure 41. Activité de piégeage du radical DPPH par l'extrait méthanolique de *Artemisia absinthium* L.

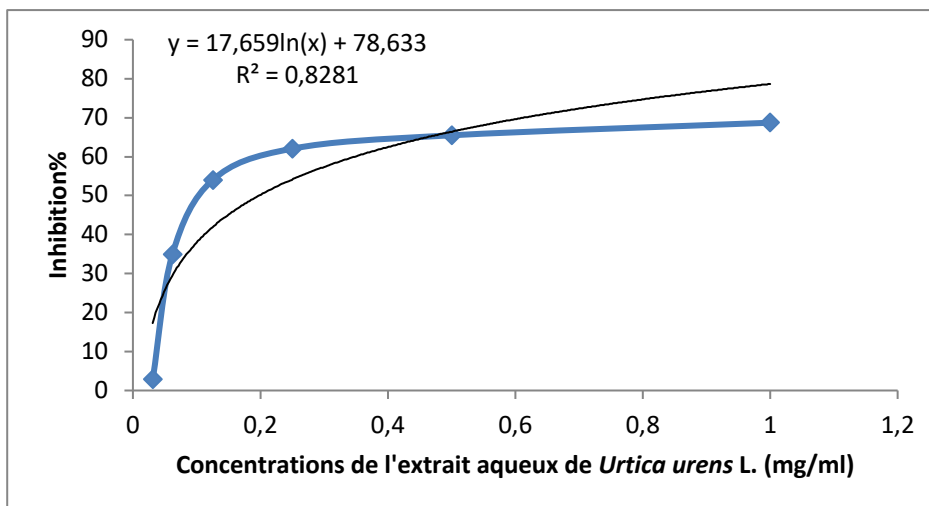


Figure 42. Activité de piégeage du radical DPPH par l'extrait aqueux de *Urtica urens* L.

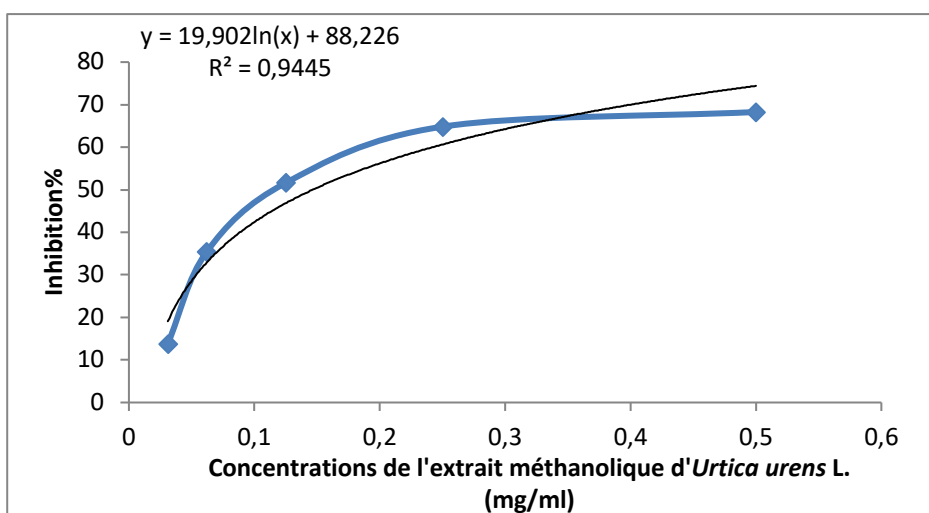


Figure 43. Activité de piégeage du radical DPPH par l'extrait méthanolique de *Urtica urens* L.

Tableau 3. Activité de piégeage du radical libre DPPH par les extraits végétaux et l'acide ascorbique.

Extraits végétaux /Acide Ascorbique	IC ₅₀ (mg/ml)
Extrait aqueux de <i>Anacyclus pyrethrum</i> L.	0,382 ± 0,11
Extrait méthanolique de <i>Anacyclus pyrethrum</i> L.	0.043 ± 0,00
Extrait aqueux de <i>Artemisia absinthium</i> L.	0.193 ± 0,00
Extrait méthanolique de <i>Artemisia absinthium</i> L.	0.107 ± 0,00
Extrait aqueux de <i>Urtica urens</i> L.	0.198 ± 0,02
Extrait méthanolique de <i>Urtica urens</i> L.	0.146 ± 0,00
Acide Ascorbique	0.00051± 0.73

Les extraits aqueux et méthanolique de *A. Pyrethrum* L., évalués par le test du DPPH, avaient montré une activité anti-radicalaire ; les deux extraits exhibaient une activité de piégeage du radical de façon proportionnelle avec les concentrations testées (fig. 38 et 39). Selon Katakai *et al.* (2012) l'extrait montre une activité antioxydante en fonction de la dose ou le solvant utilisé.

L'extrait méthanolique de *A. pyrethrum* L. piégeait le radical DPPH d'une façon remarquable ($IC_{50}=0,043 \pm 0,00$ mg/ml) ($p<0.001$). L'activité de piégeage des radicaux la plus faible ($IC_{50}=0,382 \pm 0,11$ mg/ml) avait été attribuée à l'extrait aqueux (tableau 3). Selles *et al.* (2012) ont rapporté une valeur $IC_{50}= 0.056$ mg/ml pour l'extrait méthanolique du pyrèthre et de $IC_{50}= 0.114$ mg/ml pour l'extrait aqueux. L'extrait éthanolique de *A. pyrethrum* L. avait été évalué pour les activités antioxydantes *in vivo* et *ex-vivo* en utilisant différents modèles expérimentaux à différentes concentrations 25, 50, 100, 200, 400 μ g/ml. Akarkarha a montré une bonne propriété antioxydante (IC_{50} égale à $0,056 \pm 1,92$ mg/ml) en raison de sa capacité de piégeage des radicaux hydroxyles, les peroxydes d'hydrogène et les dioxydes d'azote. Il avait également inhibé la peroxydation des lipides. Sujith *et al.* (2011) rapportent que la propriété antioxydante puissante d'Akarkarha est due à la présence d'eugénol, de phénols, de flavonoïdes, d'acide ascorbique, d'alcaloïdes et de tanins. Un $IC_{50}=12.38 \pm 0.25$ μ g/ml pour l'extrait méthanolique et 13.41 ± 0.67 μ g/ml pour l'extrait aqueux étaient les valeurs détectées par Manouze *et al.* (2017), mais les pouvoirs antioxydants des deux extraits étaient nettement inférieurs à ceux des antioxydants de référence, le butyle hydroxytoluène (BHT) et la quercétine. L'extrait hydro-alcoolique étudié par Cherrat *et al.* (2017) a donné un $IC_{50} =0.145$ mg/ml. Kalim *et al.* (2010) ont enregistré un $IC_{50}= 467.10 \pm 0.27$ μ g/ml d'extrait hydro alcoolique de racines de pyrèthre.

Rappelons que l'extrait alcoolique de pyrèthre était plus riche en polyphénols mais contenait beaucoup moins de flavonoïdes par rapport à l'extrait aqueux. Selon Sengul *et al.* (2011) une activité anti-radicalaire faible peut être attribuée à l'absence de composants de l'activité antioxydante. Ces résultats étaient en faveur de l'implication de composés phénoliques dans l'activité antioxydante des extraits de *A. pyrethrum* L. par réaction de transfert d'hydrogène. Plusieurs auteurs confirment qu'il existait une corrélation positive entre la présence des polyphénols et l'activité antioxydante, affirmant que les polyphénols sont de puissants antioxydants qui inhibent la formation de radicaux libres et s'opposent à l'oxydation des macromolécules (Kalim *et al.*, 2010 ; Cherrat *et al.*, 2017 ; Manouze *et al.*, 2017). L'extrait aqueux de *A. pyrethrum* L., bien qu'il contenait une concentration plus élevée en

flavonoïdes par rapport à l'extrait méthanolique, révèle un pouvoir anti-radicalaire très faible ($IC_{50}=0,382 \pm 0,11$ mg/ml).

Les extraits aqueux et méthanolique des feuilles de *Artemisia absinthium* L. présentent aussi une activité anti-radicalaire intéressante contre le DPPH (fig. 40 et 41). L' IC_{50} pour l'extrait méthanolique de l'absinthe est de $0.107 \pm 0,00$ mg/ml (tableau 3). Bhat *et al.* (2018) ont obtenu un $IC_{50}= 0.112 \pm 2.41$ mg/ml d'extrait méthanolique. Une valeur de 0.57 ± 0.05 mg/ml d'extrait éthanolique a été enregistrée par Craciunescu *et al.* (2012). Une valeur d' $IC_{50}=0.612 \pm 30.6$ mg/ml d'extrait méthanolique des parties aériennes d'absinthe a été enregistrée par Mahmoudi *et al.* (2009). Un $IC_{50}= 7.37$ µg/ml était la valeur trouvée par Lee *et al.* (2013) pour l'extrait aqueux des feuilles d'absinthe. Selon Msaada *et al.* (2015) l'extrait méthanolique issu des parties aériennes de *A. absinthium* L., récoltées dans la région de Boukornine (Tunisie), présentait une forte activité antioxydante avec un $IC_{50}= 0.044 \pm 1.92$ mg/ml. Ce qui justifie l'effet de la région sur l'activité antioxydante de chaque espèce. Aussi l'impact des facteurs environnementaux, les variations saisonnières, les techniques d'extraction, le rendement et la composition des extraits, avaient été évoqués par Msaada *et al.* (2012).

L' IC_{50} pour l'extrait aqueux de *A. absinthium* L. était de $0.193 \pm 0,00$ mg/ml (tableau 3). Un IC_{50} de 0.231mg/ml était la valeur trouvée par Özgen *et al.* (2004) dans l'extrait aqueux d'absinthe de Turquie. Lee *et al.* (2013) trouvent un $IC_{50}= 6.77$ µg/ml pour l'extrait éthanolique de *A. absinthium* L.

L'extrait alcoolique présente un plus grand pouvoir réducteur par rapport à l'extrait aqueux donc cela indique que les composés à forte capacité de piégeage des radicaux ont une polarité moins élevée. Cette activité anti-radicalaire de l'extrait méthanolique d'absinthe contre le DPPH pouvait être attribuée aux polyphénols et aux flavonoïdes. Canadanovic-Brunet *et al.* (2005) affirmaient que les propriétés de piégeage des composés antioxydants ; flavonoïdes et acides phénoliques sont souvent associées à leur capacité à former des radicaux stables. Par exemple, la quercétine, la rutine et l'acide chlorogénique, principaux composés antioxydants de l'absinthe, peuvent piéger efficacement les radicaux en donnant généralement naissance à des radicaux libres de semi quinone. L'absinthe contient également d'autres flavonoïdes glycosides telles que l'isoquercitrine, la quercitine-3-O-d-glucoside, la quercitine-3-O-rhamnoglucoside, l'isorhamnetine-3-O-rhamnoglucoside, l'isorhamnetine-3-glucoside, et des acides phénoliques tels que l'acide chlorogénique, syringique, coumarique, salicylique et vanilliques (Kordali *et al.*, 2005), qui sont probablement impliqué dans le mécanisme de l'activité de piégeage des radicaux libres selon Bora et Sharma (2010). Plusieurs composés de faible masse molaire ont été identifiés dans *A. absinthium* L. telles que les lactones sesquiterpéniques, les lignanes, les

monoterpènes, le thymol et le carvacrol, considérés comme les principaux composés actifs de ces plantes. Il avait été montré que ces pharmacophores possèdent une activité antioxydante et anti-radicalaire puissante (**Braca et al., 2003**).

L'activité anti-radicalaire, mesurée par la méthode au DPPH, a été également évoquée pour l'huile essentielle de *A. absinthium* L. (**Kordali et al., 2005 ; Lopes-Lutz et al., 2008**). Le chamazulene, l'un des composants essentiels de l'huile de *A. absinthium* L. ; ($17.8 \pm \text{nd} \%$) (**Kordali et al., 2005**) et $39.93 \pm 4.56\%$ (**Msaada et al., 2015**), a été signalé comme étant un puissant piègeur de radicaux hydroxyles et capable d'inhiber efficacement la peroxydation des lipides (**Siveen et Kuttan, 2011**).

Par ailleurs, les composés phénoliques, présents aussi dans *A. absinthium* L., peuvent également agir comme antioxydants en améliorant le système antioxydant endogène (**Qingming et al., 2010**). L'ajout de l'absinthe aux régimes alimentaires a un effet très percutant sur le système enzymatique antioxydant. D'ailleurs, **Kostadinovic et al. (2015)** ont montré que l'addition de *A. absinthium* L. à l'alimentation des poulets de chair entraînait une plus grande activité de la SOD dans le sang hémolysé et les homogénats de foie. L'utilisation d'absinthe pourrait être bénéfique en termes de protection antioxydante des animaux (**Popović et al., 2017**).

L'extrait aqueux d'absinthe (50, 100 ou 200 mg/kg poids corporel / jour) administré par voie orale à des souris expérimentales et l'atteinte hépatique provoquée chimiquement par une seule dose de CCl_4 (0,1% ml) montrent que l'extrait réduit de manière significative ($P < 0,05$) la peroxydation lipidique dans le tissu hépatique et rétablit les activités des enzymes antioxydantes de défense (SOD et GPx) vers des niveaux normaux (**Amat et al., 2010**). D'après **Kharoubi et al. (2008)**, *A. absinthium* L. avait restauré les activités enzymatiques perturbées par l'exposition au plomb, telles que la glutathion peroxydase et la superoxyde dismutase (15,7% et 16,4%, respectivement) et avait un rôle protecteur contre la peroxydation lipidique.

Les extraits de *Urtica urens* L. ont montré une activité antioxydante en fonction de la dose et du solvant utilisé (fig. 42 et 43). Les résultats du tableau 3 indiquent que l'extrait méthanolique de *U. urens*, qui contenait la plus grande quantité de composés phénoliques et flavonoïdes, présentait l'activité antioxydante ($\text{IC}_{50} = 0.146 \pm 0,00$ mg/ml) la plus puissante en comparaison avec l'extrait aqueux ($\text{IC}_{50} = 0.198 \pm 0,02$ mg/ml) ($p < 0.05$). **Mzid et al. (2017)** ont aussi constaté que l'extrait éthanolique de cette même espèce, provenant de Tunisie, avait un puissant pouvoir anti-radicalaire ($\text{IC}_{50} = 0.245 \pm 10,2$ mg/ml) et que l'extrait aqueux a aussi montré une activité de piégeage des radicaux libres ($\text{IC}_{50} = 0.142 \pm 10,54$ mg/ml). Selon **Manu Kumar et al. (2013)**, l'extrait méthanolique de feuilles de *U. urens* L. a décelé une activité plus

élevée (78% à 0,5 mg/ml) par rapport à l'extrait aqueux (50% à 0.5 mg/ml). Jaradat *et al.* (2016) rapportent une valeur d'IC₅₀ des extraits méthanoliques d'ortie de l'ordre de 29,70 ± 0,60 µg/ml. Une valeur d'IC₅₀ égale à 1.2 mg/ml d'extrait aqueux de *U. urens* contre la valeur de 21,8 µg/ml pour l'acide ascorbique a été enregistrée par Fattahi *et al.* (2014). À 1 mg/ml, l'extrait méthanolique donnait 91,2% et l'extrait aqueux 63,5% d'inhibition selon Jimoh *et al.* (2010). Tous ces auteurs avaient observé que ces extraits avaient la capacité de donner des protons et pourraient cependant servir d'inhibiteurs ou de piègeurs de radicaux libres.

Mzid *et al.* (2016) ont constaté que l'extrait éthanolique d'ortie améliorait l'activité des catalases (CAT), la superoxide dismutase (SOD), et la glutathione peroxidase (GPx) et réduisait par conséquent le taux de malondialdéhyde (MDA) au niveau de l'épiderme. La présence de flavonoïdes et des huiles volatiles dans *U. urens* L. est responsable de ses activités antioxydante, antimicrobienne et anti-inflammatoire (Saeed et ahmed, 2016). Selon Abdel-Wahhab *et al.* (2005), la patulétine est un flavonoïde majeur de *U. urens* L. qui possède une activité antioxydante et des effets piègeurs des radicaux libres chez des rats traités avec des Aflatoxines B1 à une dose de 7,5 mg/kg de poids corporel. En outre, ce composé est lipophile et traverse facilement la membrane cellulaire, la rendant facilement disponible dans le cytosol pour exercer son action antioxydante protectrice (Abdel-Wahhab *et al.*, 2005). Selon ces auteurs, des recherches récentes appuient l'utilisation de *U. urens* L. comme antidiabétique et hypocholestérolémiant pour le traitement de l'hyperplasie bénigne de la prostate, des infections des voies urinaires, des névralgies, de l'arthrite et d'autres troubles connexes. L'ortie a été longtemps et largement utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies.

Une différence très significative ($p < 0.001$) a été constatée entre l'activité anti-radicalaire (DPPH) des six extraits et l'acide ascorbique, utilisé comme témoin positif, dont l'IC₅₀ été de 0.00051 ± 0.73 mg/ml (tableau 3). L'activité antioxydante affichée par les six extraits étudiés suggère qu'ils peuvent avoir un potentiel de capacité neuroprotectrice.

Notre étude a montré que l'activité anti-radicalaire augmente avec la concentration des extraits et que les fortes teneurs en composés phénoliques et flavonoïdes totaux indiquent que ces composés contribuent à l'activité anti-radicalaire et antioxydante. Ces résultats confirment ceux de Rice-Evans *et al.* (1996) et Pietta (2000) qui avaient déduit que les substances phytochimiques naturelles, telles que les composés phénoliques, présentent dans leurs structures moléculaires des anneaux aromatiques, avec un ou plusieurs groupes hydroxyles. Ces composés peuvent agir en tant qu'antioxydants car leur système étendu d'électrons conjugués permet un transfert rapide d'électrons ou d'atomes hydrogène des groupements hydroxyles vers les radicaux libres.

5.3.2. Test du pouvoir réducteur

Le cerveau possède le taux métabolique le plus élevé de tous les tissus et recourt obligatoirement au métabolisme aérobie. Ceci, combiné à des concentrations élevées d'ions métalliques Cu^+ et Fe^+ , augmente sa vulnérabilité au stress oxydatif. La grande majorité des ROS proviennent des réactions redox des métaux (Abuhamadah, 2014).

Il existe de nombreuses méthodes pour tester la capacité antioxydante d'un extrait végétal. La méthode du pouvoir réducteur a été utilisée dans la présente étude. Le pouvoir réducteur est représenté par la valeur d' IC_{50} ; les concentrations de l'antioxydant fournissant une réduction de 50 % de la solution d'essai (tableau 4).

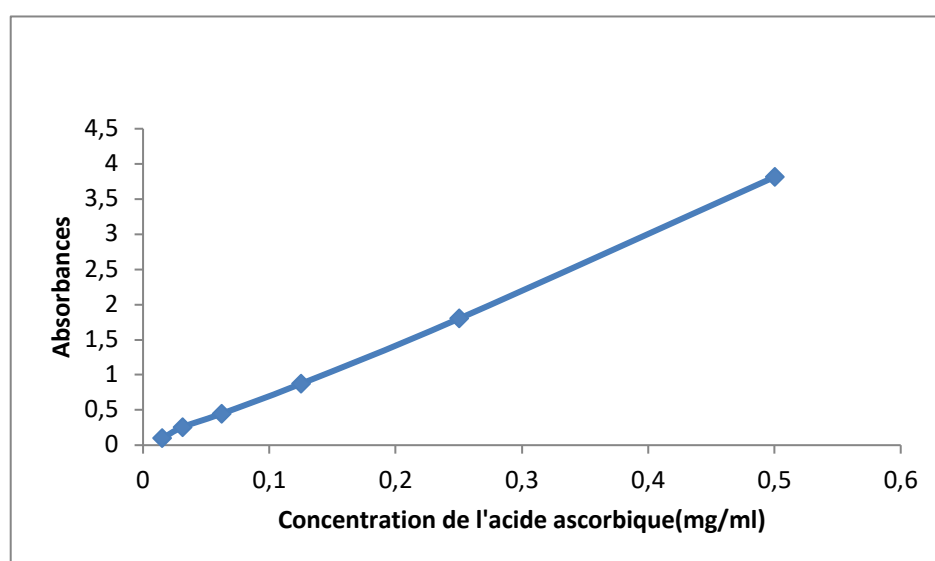


Figure 44. Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique.

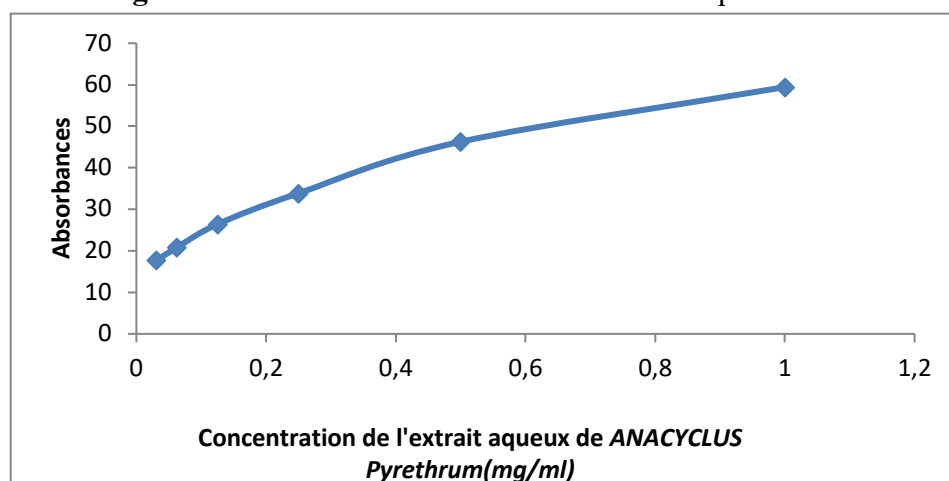


Figure 45. Pouvoir réducteur de l'extrait aqueux de *Anacyclus pyrethrum* L.

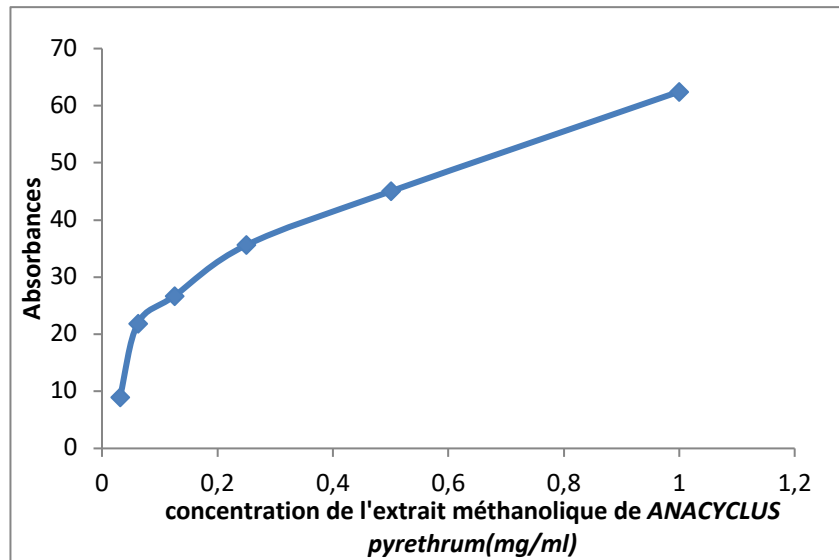


Figure 46. Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique de *Anacyclus pyrethrum* L.

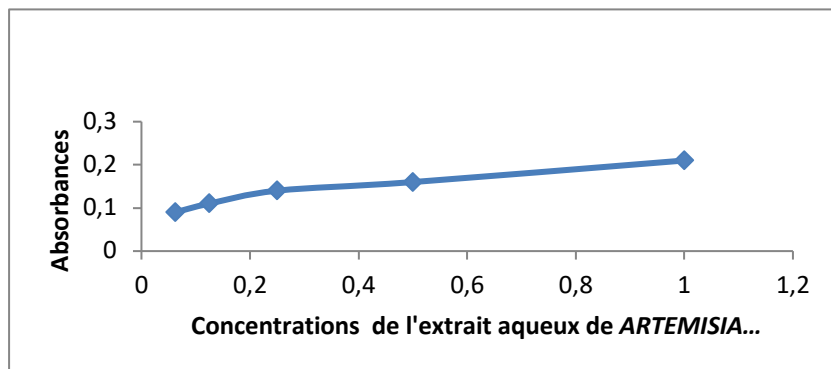


Figure 47. Pouvoir réducteur de l'extrait aqueux de *Artemisia absinthium* L.

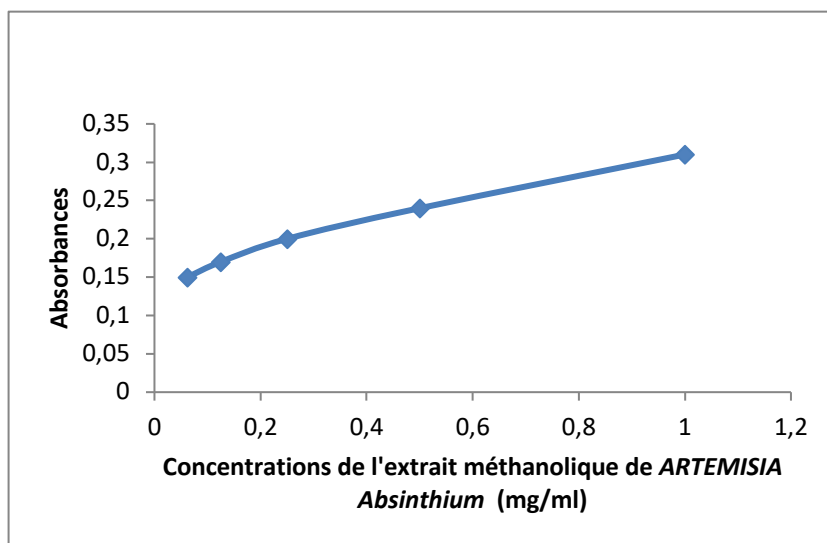


Figure 48. Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique de *Artemisia absinthium* L.

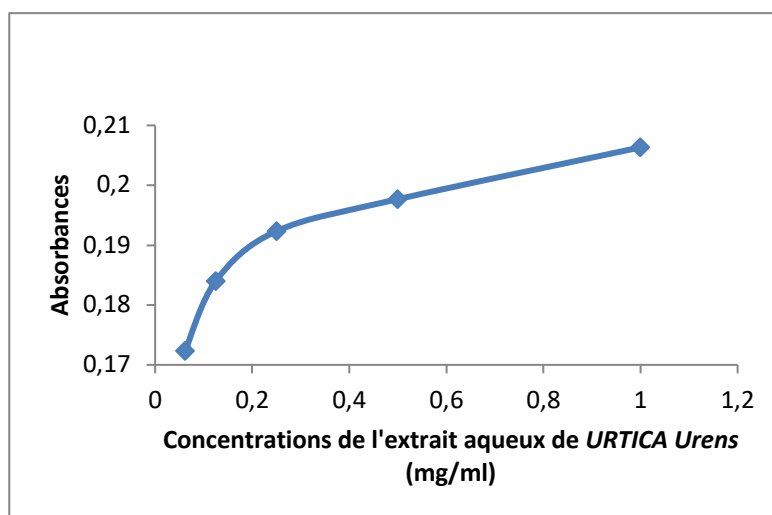


Figure 49. Pouvoir réducteur de l'extrait aqueux de *Urtica urens* L.

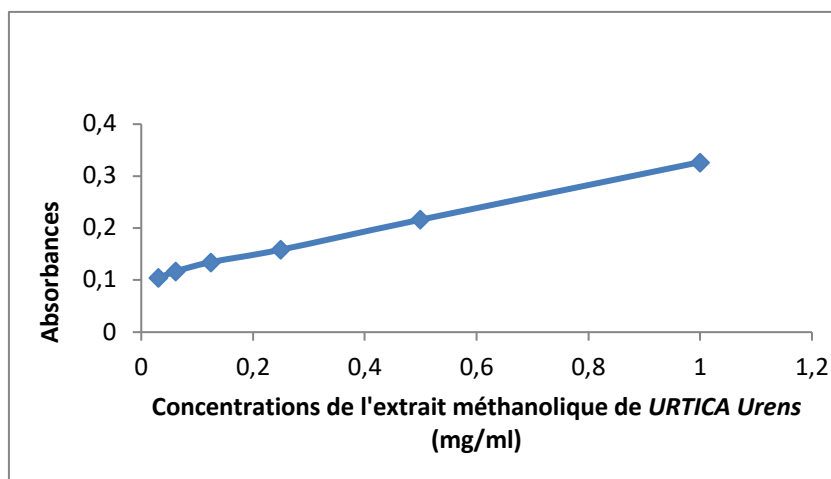


Figure 50. Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique de *Urtica urens* L.

Tableau 4. Pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanoliques des trois plantes et de l'acide Ascorbique.

Extraits végétaux /acide ascorbique.	IC ₅₀ (mg/ml)
Extrait aqueux de <i>Anacyclus pyrethrum</i> L.	0.66 ± 0.05
Extrait méthanolique de <i>Anacyclus pyrethrum</i> L.	0.63 ± 0.065
Extrait aqueux de <i>Artemisia absinthium</i> L.	0.950 ± 0.038
Extrait méthanolique de <i>Artemisia absinthium</i> L.	0.901 ± 0.013
Extrait aqueux de <i>Urtica urens</i> L.	2.610 ± 0.3
Extrait méthanolique de <i>Urtica urens</i> L.	0.186 ± 0.006
Acide Ascorbique.	0.018 ± 0.003

Le pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanolique de *A. pyrethrum* L., de *A. absinthium* L. et de *U. urens* L. évalué par la méthode d'Oyaizu (1986) où l'acide ascorbique a servi comme témoin positif (fig.44). Selon Meir *et al.* (1995) la capacité réductrice d'un composé peut constituer un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle. Cette capacité réductrice est généralement associée à la présence de réductones qui rompent la chaîne des radicaux libres en faisant don d'un atome d'hydrogène ou d'électron. Il a également été rapporté que les réductones réagissent avec certains précurseurs du peroxyde empêchant ainsi leur formation (Bora et Sharma, 2011).

Les extraits de *A. pyrethrum* L. qu'ils soient aqueux ou méthanoliques ont montré un pouvoir réducteur presque similaire ($p > 0.05$) où l'IC₅₀ était de $0,66 \pm 0,05$ mg/ml et $0,63 \pm 0,065$ mg/ml respectivement (tableau 4). Ce pouvoir réducteur augmente avec la hausse des concentrations des deux extraits (fig.45 et 46). Des résultats semblables ont été trouvés par Sujith *et al.* (2011) qui confirmaient que le pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique de *A. pyrethrum* L. augmentait avec l'augmentation de ses concentrations. Des IC₅₀= 50.89 ± 1.25 µg/ml pour l'extrait méthanolique et de 60.17 ± 4.48 µg/ml pour l'extrait aqueux du pyrèthre du Maroc ont été constatés par Manouze *et al.* (2017). Dans une étude menée par Selles *et al.* (2012), l'extrait méthanolique du pyrèthre de Tlemcen présentait un pouvoir réducteur un peu plus fort par rapport à l'extrait aqueux. En effet, l'absorbance de l'extrait méthanolique à 0,10 mg/ml était de 0,359, valeur supérieure à celle des extraits à l'eau dont l'absorbance était de 0,281. De même, à 0,15 mg/ml la capacité de réduction ferrique la plus élevée résidait dans l'extrait méthanolique (0,569) par rapport aux extraits à l'eau (0,301). Sujith *et al.* (2011) ont abouti à la même conclusion puisque à 400 µg/ml l'absorbance calculé était de 0.241 alors qu'à 25 µg/ml elle était égale à 0.022.

Pour les extraits aqueux et méthanoliques de *A. absinthium* L., l'IC₅₀ pour le premier est de 0.950 ± 0.038 mg/ml alors que l'extrait alcoolique présente un IC₅₀ égale à 0.901 ± 0.013 mg/ml ($p > 0.05$) (tableau 4). D'après Mahmoudi *et al.* (2009), l'extrait méthanolique d'absinthe présentait une bonne activité réductrice entre 0.05 et 0.800 mg /ml. Selon ces auteurs, la présence de réducteurs (antioxydants) donneurs d'électron dans les échantillons entraînera la réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺. Par ailleurs, Msaada *et al.* (2015) ont trouvé que les extraits méthanoliques d'absinthe obtenus à partir des lots issus des régions de Bou Salem, de Jerissa et de Boukornine (Tunisie), étaient plus actifs que l'acide ascorbique dont l'EC₅₀ = $4,2 \pm 0,11$ g/ml.

À 0.05, 0.100 et 0.200 mg/ml, les extrait méthanoliques d'absinthe ont montré des activités plus faibles que le BHT ($p < 0,05$) mais à une concentration de 0.400 mg/ml d'extrait

d'absinthe, un pouvoir réducteur significatif ($p < 0,05$) a été enregistré (**Bora et Sharma, 2011**). Lee *et al.* (2013) confirmaient que l'extrait méthanolique d'absinthe possédait un pouvoir réducteur supérieur à celui de l'extrait aqueux. Plusieurs auteurs avaient conclu que le pouvoir réducteur de cet extrait a été proportionnel à ses concentrations (**Bora et Sharma, 2011 ; Lee et al., 2013 ; Msaada et al., 2015**). Ces résultats corroborent avec ceux obtenus dans cette recherche (fig.47 et 48).

Une différence significative ($p < 0,001$) du pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanolique de *Urtica urens* L. a été observée (fig.49 et 50), un IC_{50} de $2,610 \pm 0,3$ mg/ml pour l'extrait aqueux et $0,186 \pm 0,006$ mg/ml pour l'extrait alcoolique (tableau 4). Ce pouvoir réducteur réduit de l'extrait aqueux est peut être du à la faible teneur des flavonoïdes ($5,61 \pm 0,20$ μ g QE/mg) d'ortie par rapport à celle contenue dans l'extrait alcoolique ($28,91 \pm 2,34$ μ g QE/mg). La quantité des polyphénols dans l'extrait méthanolique de *U. urens* L. était également un peu plus élevée que celle contenue dans l'extrait à l'eau ($p < 0,05$). Les composés phénoliques présentent une activité antioxydante en raison de leurs propriétés rédox. Selon Lee *et al.* (2013), la capacité réductrice d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son potentiel antioxydant.

5.4. Test de Neurotoxicité : traitement des cultures cellulaires CAD avec les extraits des plantes (*Anacyclus pyrethrum* L., *Artemisia absinthium* L. et *Urtica urens* L.)

La toxicité des extraits aqueux et méthanolique de *Anacyclus pyrethrum* L., de *Artemisia absinthium* L. et de *Urtica urens* L. sur des cellules CAD a été examinée à l'aide du test MTT (bromure de 3- [4,5-diméthyl-2-thiazolyl] -2,5, diphényltétrazolium). Ce test est basé sur une réaction colorimétrique dans laquelle le MTT est réduit par la réductase mitochondriale (les déshydrogénases) des cellules viables en composé Formosan bleuâtre, soluble dans l'isopropanol. Ce qui reflète le fonctionnement normal des mitochondries et la viabilité cellulaire selon Sylvestre *et al.* (2005) et Mohammadi *et al.* (2016), déterminée en mesurant la densité optique (DO) à 570 nm. Pour cette fin, 24 heures de traitement des cellules CAD avec une gamme de concentrations (0,0001, 0,001, 0,01, 0,1 et 1 mg/ml) de chaque extrait avaient été effectuées, suivi par le test de neurotoxicité ou test du MTT.

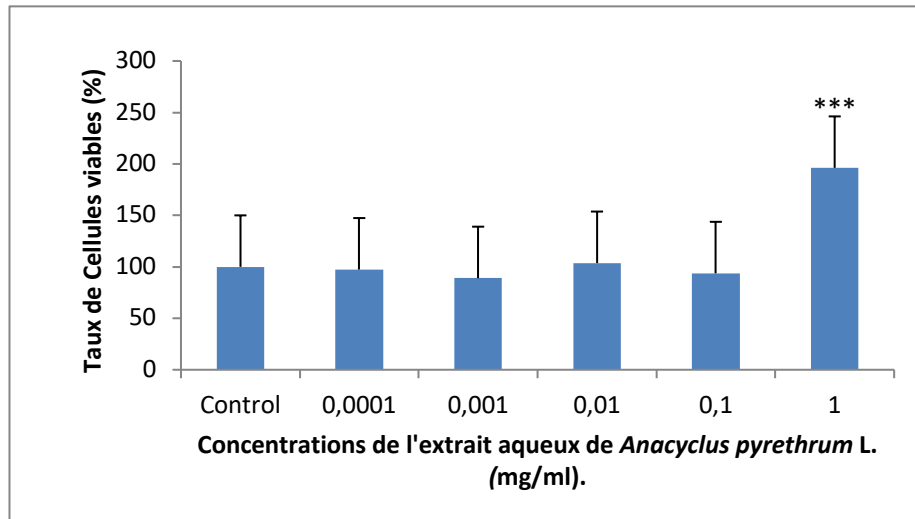


Figure 51. Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait aqueux de *A. pyrethrum* L. pendant 24 heures. Des concentrations de 0,0001, 0,001, 0,01 et 0,1 mg/ml n'ont provoqué aucun effet neurotoxique sur les cellules CAD. En fait, à 1 mg/ml d'extrait aqueux de *A. Pyrethrum*, le taux de survie cellulaire était plus élevé après 24h de traitement, *** $p < 0,001$ par rapport au control.

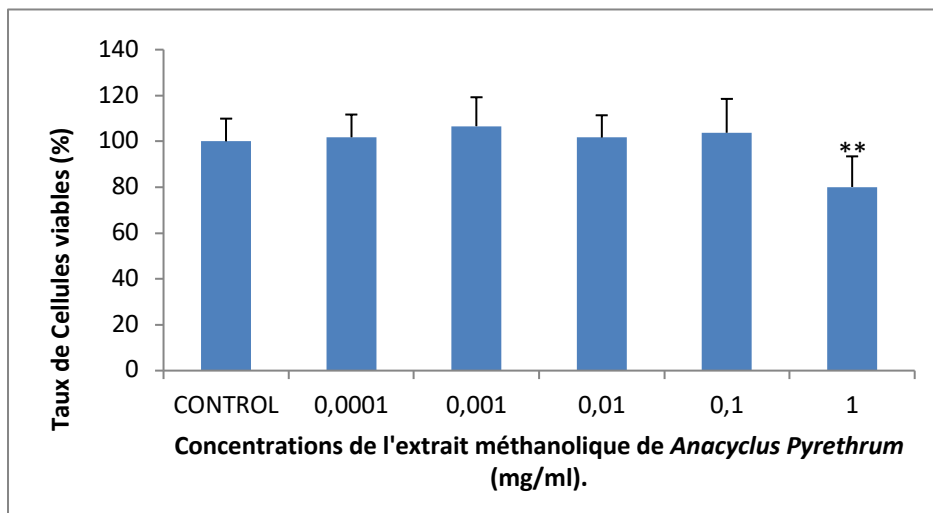


Figure 52. Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait méthanolique de *A. pyrethrum* L. pendant 24 heures. Les concentrations de 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1 mg/ml n'ont pas induit d'effet neurotoxique ou de viabilité accrue sur les cellules CAD.

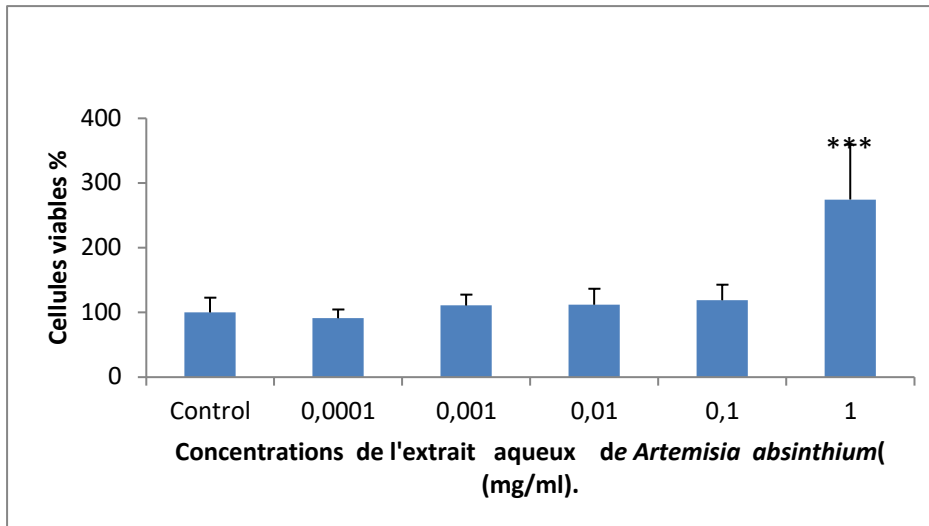


Figure 53. Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait aqueux de *A. absinthium* L. pendant 24 heures. Les concentrations de 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1 mg/ml n'ont pas induit d'effet neurotoxique sur les cellules CAD. À 1 mg/ml l'extrait aqueux de *A. absinthium* L., le taux de survie cellulaire était plus élevé après 24h de traitement, *** $p < 0.001$ par rapport au control.

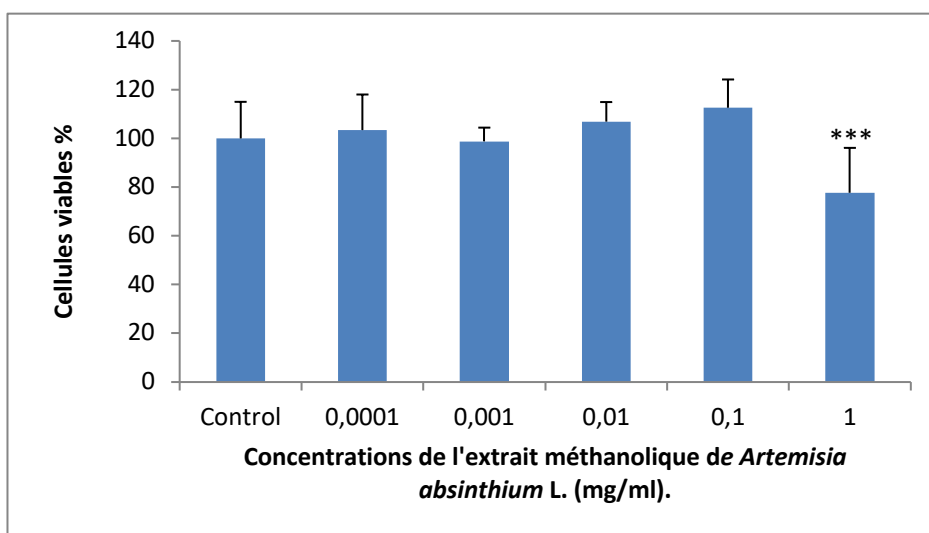


Figure 54. Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait méthanolique de *A. absinthium* L. pendant 24 heures. Les concentrations de 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1 mg/ml n'ont pas induit d'effet neurotoxique sur les cellules CAD. *** $p < 0.001$ par rapport au control.

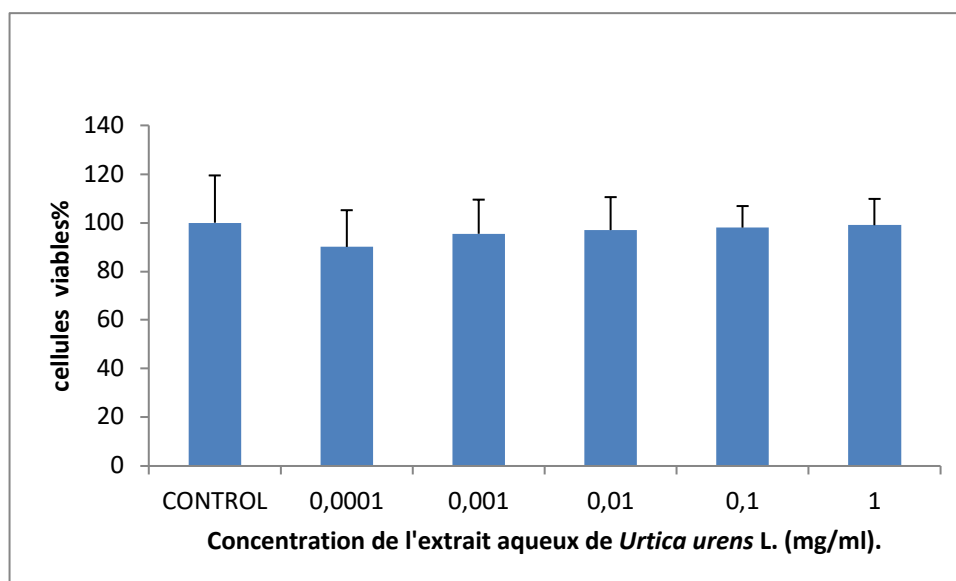


Figure 55. Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait aqueux de *U. urens* L. pendant 24 heures. Les concentrations de 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1 et 1mg/ml n'avaient induit aucun effet neurotoxique sur les cellules CAD. $p > 0.05$.

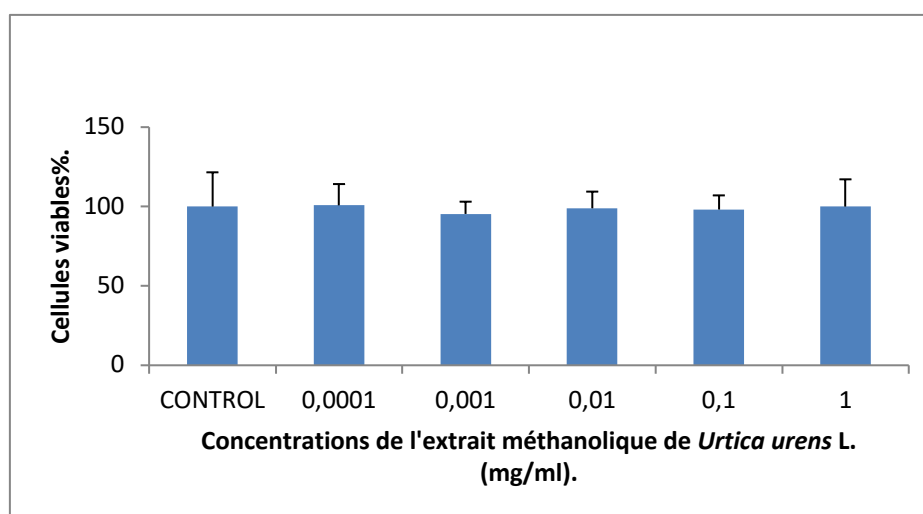


Figure 56. Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait méthanolique de *U. urens* L. pendant 24 heures. Les concentrations de 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1 et 1 mg/ml n'avait pas induit d'effet neurotoxique sur les cellules CAD, $p > 0.05$.

Les résultats des figures 51 et 52, des concentrations de 0,1 à 0,0001 mg/ml d'extrait aqueux et méthanolique de *A. pyrethrum* L. n'avaient provoqué aucun effet neurotoxique sur les cellules CAD. Par conséquent, on avait opté pour ces concentrations afin d'effectuer le test de neuroprotection. De plus, l'extrait aqueux contrairement à l'extrait au méthanol augmentait significativement la viabilité cellulaire sur une période de 24 heures à une concentration élevée de 1 mg/ml. Plusieurs recherches affirmaient que le pyrèthre ne présente aucun danger particulier. Une étude de toxicité aiguë réalisée conformément au directif n°423 de

l'organisation pour la coopération et le développement économique (OCDE, 2001) montre que l'administration orale de l'extrait aqueux et méthanolique de *A. pyrethrum* L. à des doses allant jusqu'à 5000 mg/kg n'a provoqué aucun signe ou symptôme visible de toxicité chez des souris suisses mâles adultes (Manouze *et al.*, 2017). Selon ces auteurs, aucune mortalité ni changement significatif du poids corporel ($p > 0,05$) ou du poids des organes ($p > 0,05$) n'a été observé 14 jours après l'administration des extraits. Dans des études de toxicité aiguë de la racine de *A. pyrethrum* L. chez des rats albinos, aucune mortalité et modifications significatives des paramètres de poids corporel et de bien-être n'ont enregistré à 175, 550 et 2000 mg/kg poids corporel (Kumar et Lalitha, 2013). Zaidi *et al.* (2013) ont mis en évidence une activité anxiolytique significative sans évidence de neurotoxicité à une dose testée de 1600 mg/kg.

Pour évaluer la toxicité subchronique de l'extrait de *A. pyrethrum* L. chez des rats albinos Wistar, un extrait éthanolique préparé à 2% (v/v de tween 80) a été administré par gavage oral à des rats à la dose de 1000 mg/kg par jour pendant 90 jours. Les résultats ont révélé aucune mortalité ou preuve d'effets indésirables sur l'administration orale de l'extrait. Ce dernier ne présentait aucune anomalie toxicologique liée au traitement et peut être considéré comme sûr pour un traitement à long terme (Sujith *et al.*, 2012).

La toxicité aiguë de l'extrait éthanolique de racines de *A. pyrethrum* L. a été déterminée chez des souris albinos femelles. L'extrait a été administré à des doses de 300, 2000, 5000 mg/kg et la mortalité a été observée après 24 h. Il a été constaté que l'extrait à l'éthanol était sans danger aux doses utilisées et qu'il n'y avait pas de mortalité à des doses supérieures à 2g/kg (Gautam *et al.*, 2011). On peut tout de même noter que l'extrait méthanolique de *Anacyclus pyrethrum* L. (1mg/ml) avait un effet neurotoxique significatif ($p < 0,05$) sur les cultures de cellules CAD par rapport au contrôle. Une étude dirigée par l'organisation pour la coopération économique et le développement (OCDE, 2008) confirme que les extraits de racines de cette drogue ne provoquent aucune toxicité apparente chez les modèles animaux. Bien qu'à forte dose, la racine irrite la membrane muqueuse de l'intestin et provoque des selles avec saignement et des dermatites de contact en cas de mauvaise manipulation (Kumar et choudhary, 2016). Cette plante ne peut pas être dépourvue d'effets toxiques selon une étude réalisée par Daoudi *et al.* (2014). Elle peut provoquer des problèmes respiratoires, une gastro-entérite, des coliques, une irritation de la peau, des muqueuses, un bourdonnement d'oreille et même une perte de conscience (Bellakhdar, 1997 ; Hmamouchi, 1999).

Des concentrations de 0,1 à 0,0001 mg/ml d'extrait aqueux et méthanolique de *A. absinthium* L. n'ont provoqué aucun effet neurotoxique, par conséquent ces concentrations ont été sélectionnées pour les tests de neuroprotection (fig. 53 et 54). Concernant l'extrait

méthanolique des feuilles de *A. absinthium* L. (1mg/ml), un effet neurotoxique très prononcé ($p < 0.001$) sur les cellules CAD a été enregistré. L'utilisation chronique de *A. absinthium* L. a été signalée comme ayant un effet neurotoxique dû à la présence de Thujone.

Le Thujone, un composant caractéristique de l'huile essentielle de *A. absinthium* L., est une toxine connue du système nerveux central. Cependant, le risque toxicologique lié à l'utilisation des préparations d'absinthe est très bas car les extraits aqueux contiennent peu de Thujone (**Beigh et Ganai, 2017**). D'après Pinto-Scognamiglio (**1968**), l'administration chronique de 10 mg/kg de thujone par voie orale à des rats n'altère pas l'activité spontanée ou le comportement conditionné. Patočka et Plucar (**2003**) rapportent une DL_{50} de l'alpha-thujone chez la souris d'environ 45 mg/kg.

Pour exclure l'effet cytotoxique possible des extraits éthanoliques d'absinthe, plusieurs concentrations (10-1000 mg/l) ont été testées sur des cellules NCTC (fibroblastes). Des taux de viabilité cellulaire supérieure à 80% ont été enregistrés pour des concentrations allant jusqu'à 500 mg/l d'extrait d'absinthe. Des concentrations plus élevées induisent une perturbation de la rétention de rouge neutre et de la viabilité cellulaire qui diminuait de manière significative ($p < 0,01$) jusqu'à 30,46% par rapport au contrôle négatif (100%) (**Craciunescu et al., 2012**).

Craciunescu *et al.* (**2012**) ont également rapporté que les cellules NCTC traitées avec 10-500 mg/l d'extrait d'absinthe sécrètent moins de 15% de LDH dans le milieu de culture. L'Agence européenne des médicaments a proposé que l'apport quotidien de 3,0 mg d'absinthe par personne s'avère acceptable pour une durée maximale de 2 semaines (**Mubashir et al., 2017**). L'extrait aqueux (1mg/ml) contrairement à l'extrait méthanolique augmente significativement ($p < 0.001$) la viabilité cellulaire sur une période de 24 heures. Ceci peut être pro-prolifératif et/ou cytoprotecteur dans ces conditions de culture cellulaire.

Selon Marrassini *et al.* (**2010**), bien que les orties soient utilisées depuis longtemps comme aliment nutritif ou comme remède à base de plantes, des études de toxicité aiguë et subaiguë rigoureuses sont nécessaires pour confirmer l'innocuité de cette plante dans le traitement des symptômes d'inflammation et de la douleur. Ainsi, nos résultats de l'espèce *U. urens* L. utilisée à des concentrations de 0.1 à 1 mg/ml d'extrait méthanolique et aqueux ne montrent aucune neurotoxicité chez les cellules CAD ($p > 0.05$) et par conséquent ces doses ont été sélectionnées pour le test de neuroprotection (fig. 55 et 56). Ces résultats concordaient avec ceux de plusieurs auteurs (**Doukkali et al., 2015 ; Saeed et Ahmad, 2016**). Une étude de toxicité aiguë a été suivie conformément au modèle de l'OECD 423 (**OECD/OCDE, 2002**). Doukkali *et al.* (**2015**) rapportent que l'administration orale d'extrait méthanolique de feuilles de *U. urens* L. à une dose de 2000 mg/kg de poids corporel de souris adultes n'induit aucun changement significatif

du poids corporel entre le groupe traité et le témoin, avec absence de signes de toxicité tels que convulsions, hypothermie, hyperactivité.

Une dose de 25 mg/kg/jour de *U. urens* L. a été administrée par voie orale à des lapins albinos pendant trois mois, les résultats obtenus confirment l'utilisation sans danger voir efficace de cette espèce à la dose prescrite et pendant la période recommandée (**Saeed et Ahmad, 2016**). L'extrait aqueux d'ortie n'était pas cytotoxique pour les macrophages et les hépatocytes de souris à des concentrations bioactives de 200 et 350 µg/ml. Par conséquent, Carvalho *et al.* (**2017**) suggèrent son utilisation sans danger dans les applications alimentaires.

L'effet cytotoxique de l'extrait aqueux d'ortie a été déterminé sur les lignées de cellules BT-474 après une exposition de 24, 48 et 72 h. La viabilité des cellules BT-474 n'a pas été affectée par les concentrations d'extrait jusqu'à 1,5 mg/ml mais elle a diminué de moitié (contrôle) en présence de 3 mg/ml d'extrait (**Fattahi et al., 2014**). Les médicaments à base de plantes peuvent provoquer certains effets secondaires. Leur survenue dépend de la dose du médicament pris, de la durée du traitement et du type de médicament.

5.5. Test de neuroprotection : traitement des cultures cellulaires CAD avec les extraits des plantes (*Anacyclus pyrethrum* L., *Artemisia absinthium* L. et *Urtica urens* L.)

Les radicaux libres ont un rôle important dans le métabolisme cellulaire et moléculaire. Ils jouent particulièrement le rôle de second messager dans les voies de signalisation intracellulaire (**Valko et al., 2006**). Les antioxydants disponibles dans le commerce obtenus par synthèse chimique possèdent généralement un très grand pouvoir antioxydant à effet non spécifique bloquant ainsi les voix de signalisation qui font intervenir les radicaux libres. C'est dans ce contexte que la recherche d'antioxydants naturels à base de plantes s'est avérée utile, sachant que ces dernières avaient développé des systèmes efficaces les protégeant du stress oxydatif provenant de l'environnement.

Les effets du peroxyde d'hydrogène sur les cellules CAD ont été étudiés avec une période d'incubation de 2 heures. La concentration de 250 µM H₂O₂ a été choisie pour étudier les propriétés neuroprotectrices des extraits aqueux et méthanoliques de *A. pyrethrum* L., de *A. absinthium* L. et de *U. urens* L. Les cellules sont pré-traitées avec les extraits de plantes 24 h avant l'application du peroxyde d'hydrogène. Parmi les six extraits végétaux seul l'extrait aqueux de *A. pyrethrum* L. (0.1 mg/ml) avait montré une neuroprotection vis-à-vis de l'H₂O₂ (fig.57).

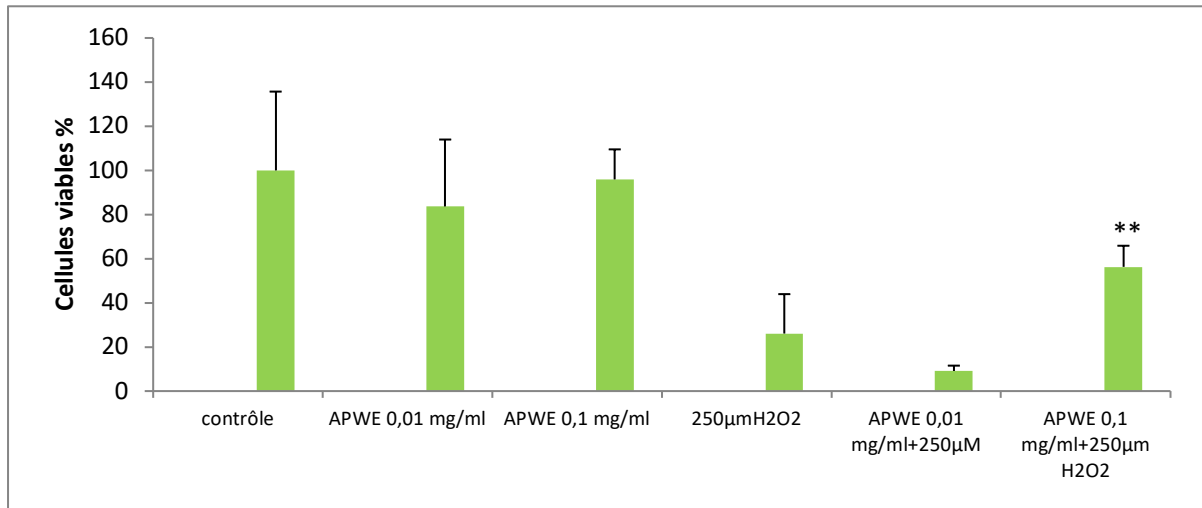


Figure 57. Protection partielle des cultures de cellules CAD par l'extrait aqueux de *A. pyrethrum* L. (0.1 mg/ml) après 2 heures de traitement avec 250 µM de peroxyde d'hydrogène. ** $p < 0.01$ comparé aux cellules traitées avec 250 µM d'H₂O₂.

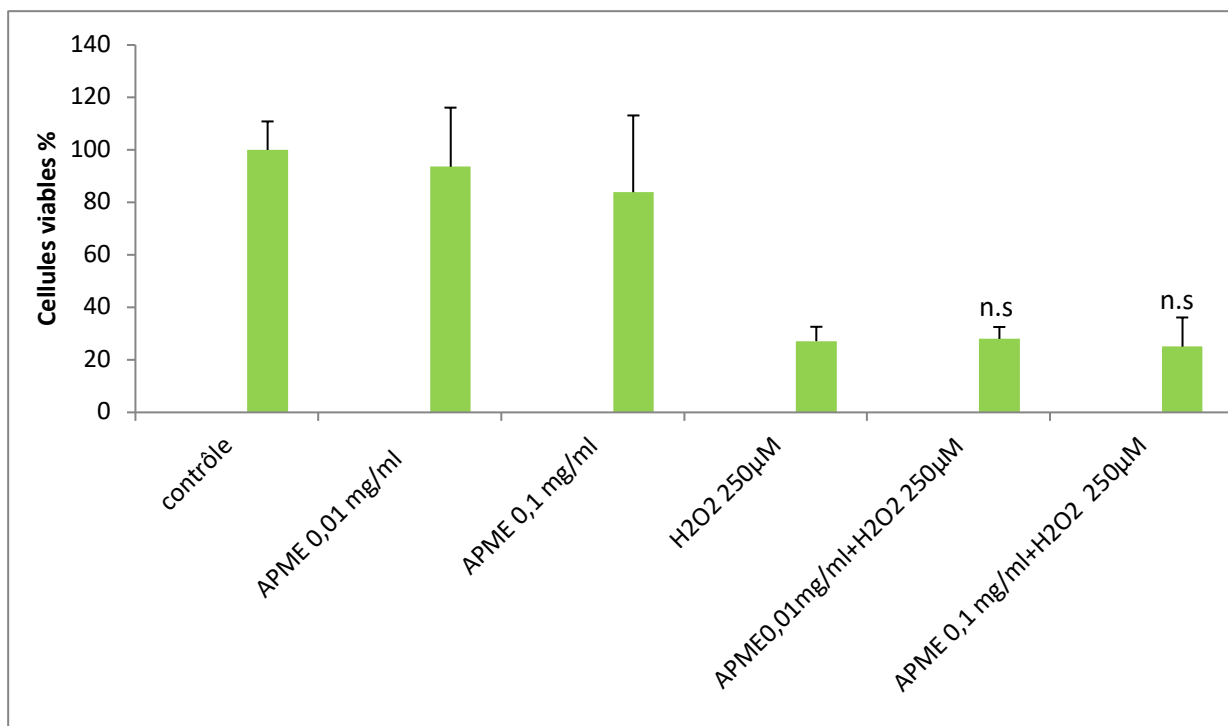


Figure 58. Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait méthanolique de *A. pyrethrum* L. (0.1 et 0.01 mg/ml) après 2 heures de traitement avec 250 µM de peroxyde d'hydrogène. $p > 0.05$ comparé aux cellules traitées avec 250 µM d'H₂O₂.

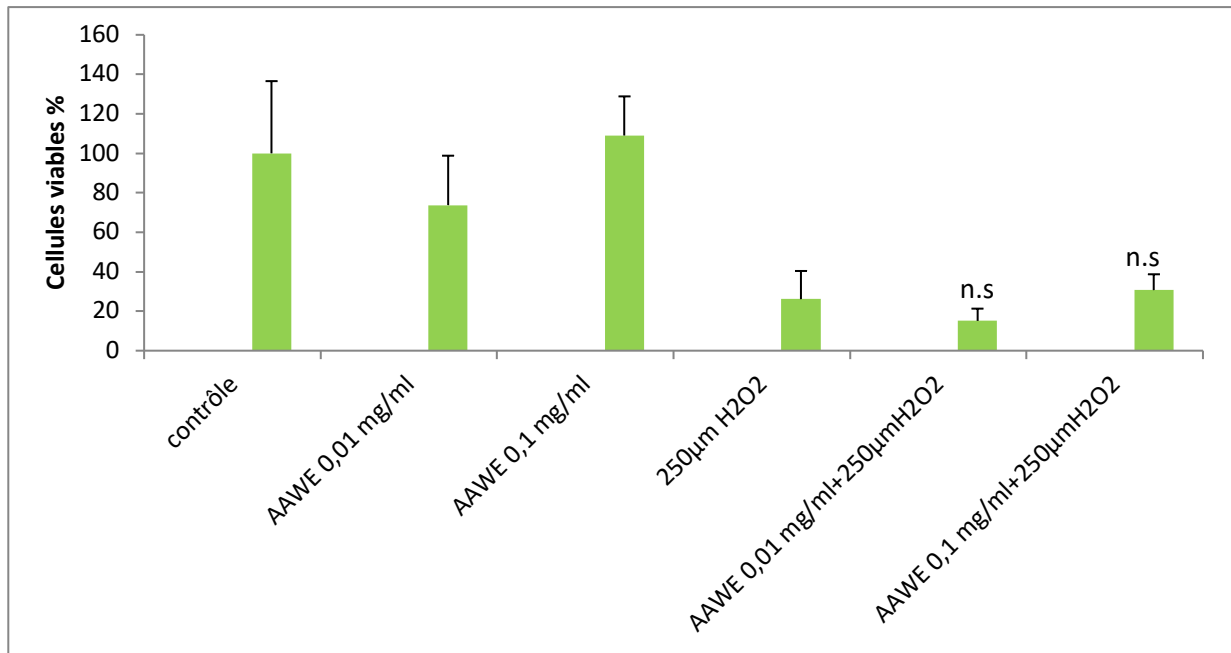


Figure 59. Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait aqueux de *A. absinthium* L. (0.1 et 0.01 mg/ml) après 2 heures de traitement avec 250 µM de peroxyde d'hydrogène. $p > 0.05$ comparé aux cellules traitées avec 250 µM d'H₂O₂.

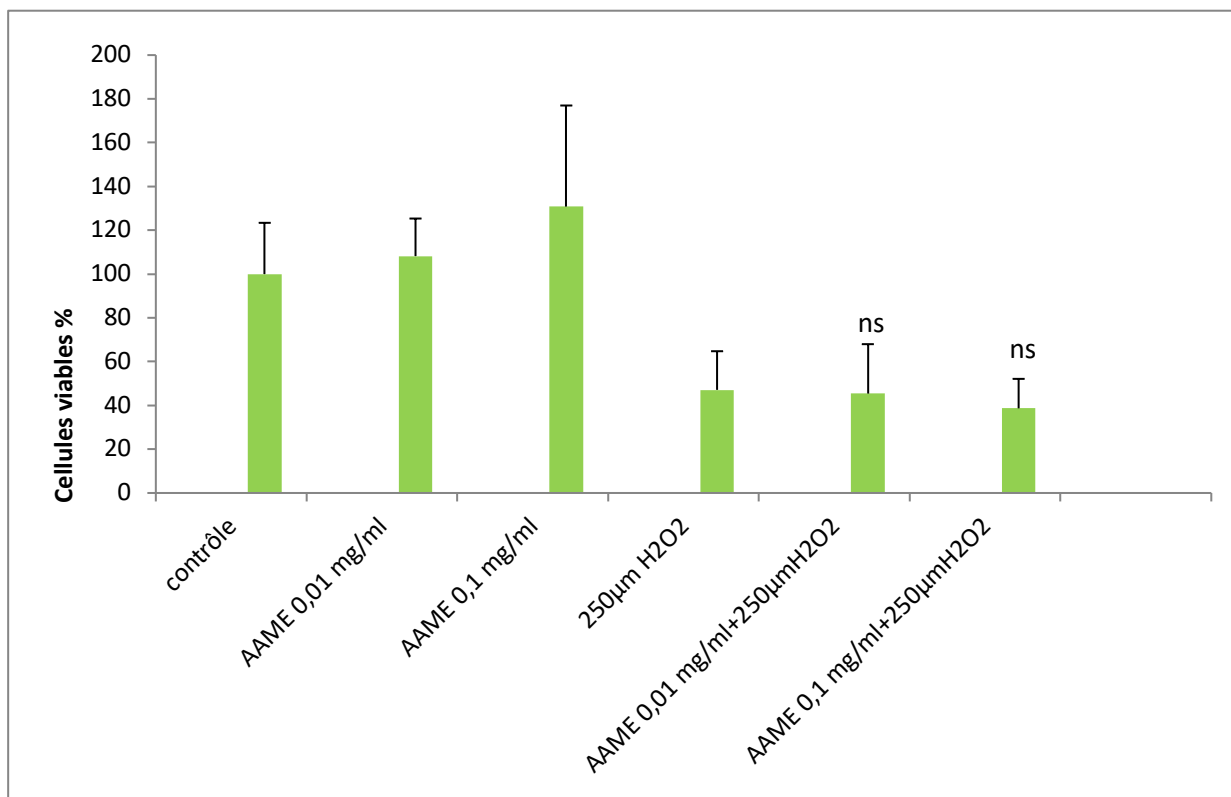


Figure 60. Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait méthanolique de *A. absinthium* L. (0.1 et 0.01 mg/ml) après 2 heures de traitement avec 250 µM de peroxyde d'hydrogène. $p > 0.05$ comparé aux cellules traitées avec 250 µM d'H₂O

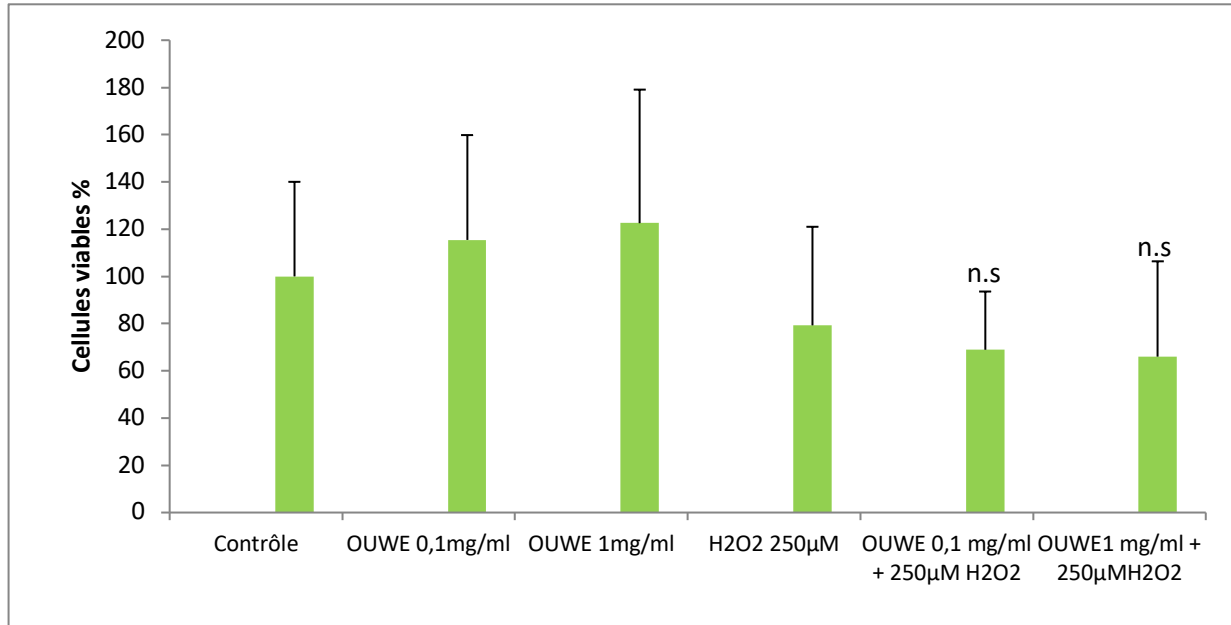


Figure 61. Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait aqueux de *U. urens* L. (0.1 et 1 mg/ml) après 2 heures de traitement avec 250 µM de peroxyde d'hydrogène. $p > 0.05$ comparé aux cellules traitées avec 250 µM d' H_2O_2 .

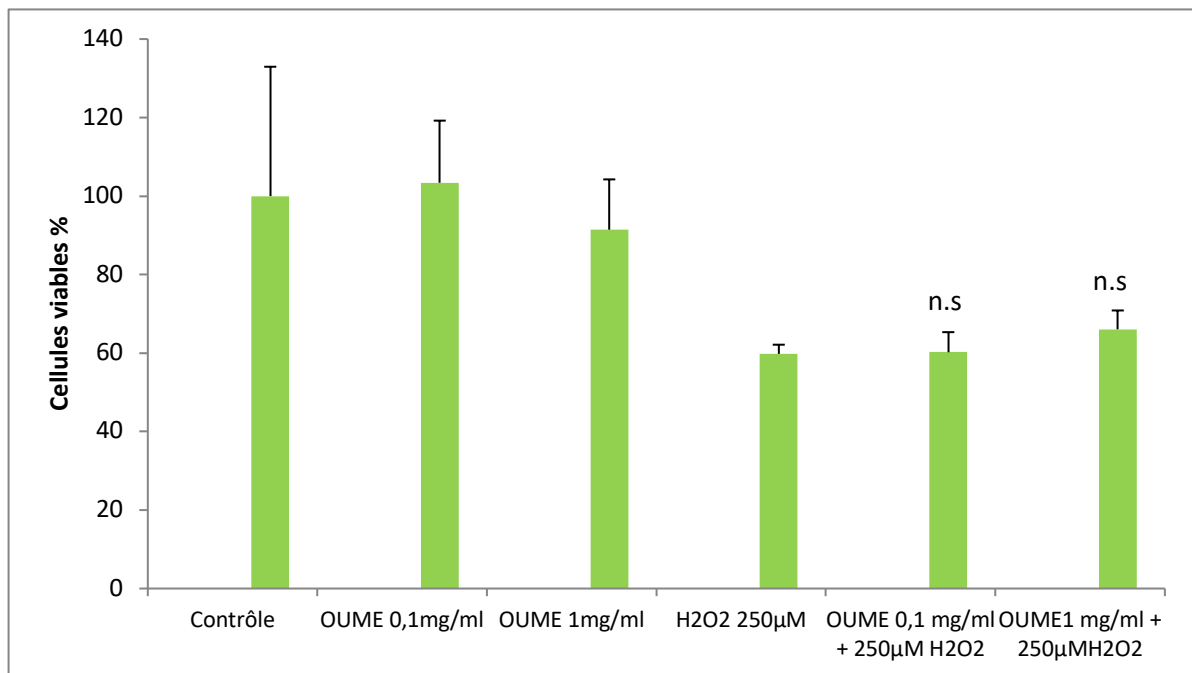


Figure 62. Traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait méthanolique de *U. urens* L. (0.1 et 1 mg/ml) après 2 heures de traitement avec 250 µM de peroxyde d'hydrogène. $p > 0.05$ comparé aux cellules traitées avec 250 µM d' H_2O_2 .

Il est bien connu que le stress oxydatif induit par H₂O₂ augmente considérablement les niveaux de ROS intracellulaires et peut induire une apoptose ou une nécrose par des changements microenvironnementaux intracellulaires (**Mattson, 2006**). D'après Al-Yafaee *et al.* (**2014**) le peroxyde d'hydrogène est cytotoxique et l'exposition des cellules et des tissus en culture à cette molécule peut entraîner un déséquilibre du métabolisme énergétique, une peroxydation des lipides et des protéines de la membrane cellulaire, ainsi qu'une perte de l'intégrité de la membrane et de la fonction normale pouvant éventuellement conduire à l'apoptose et à la mort neuronale. Des niveaux de peroxyde d'hydrogène égaux ou inférieurs à environ 20–50 mg semblent avoir une cytotoxicité limitée pour de nombreux types de cellules. L'élimination du peroxyde d'hydrogène ainsi que l'anion superoxyde est très importants pour la protection (**Bora et Sharma, 2011**). De plus le stress oxydatif résultant de la formation accrue de peroxyde d'hydrogène et de radicaux libres dérivés de l'oxygène peut déclencher une cascade d'événements, notamment un dysfonctionnement de la respiration mitochondriale et de l'excitotoxicité et une augmentation fatale du calcium cytosolique, ainsi qu'une nécrose ou une apoptose des cellules (**Van Houten et al., 2006**). Le peroxyde d'hydrogène en lui-même n'est pas très réactif mais il peut parfois être toxique en donnant naissance au radical hydroxyle dans les cellules. C'est pour cette raison que la suppression de cet élément est impérative pour la défense antioxydante dans les cellules ou dans les systèmes alimentaires. Selon Sujith *et al.* (**2011**), l'H₂O₂ peut générer un radical hydroxyle par la réaction de fenton et peut également traverser facilement la membrane cellulaire et exercer un effet nuisible sur les tissus par un certain nombre de mécanismes différents, tels que la perturbation du Ca²⁺ intracellulaire, l'augmentation de l'ATP intracellulaire, l'endommagement de l'ADN et l'induction de l'apoptose.

Un effet neuroprotecteur clair ($p < 0.01$) a été observé avec l'extrait aqueux des racines de *A. pyrethrum* L. à la concentration de 0.1mg/ml, en revanche aucun effet de cet extrait n'a été remarqué sur les mêmes cellules à la concentration de 0.01mg/ml (fig.57) La protection significative observée avec l'extrait aqueux de *A. pyrethrum* L. est en accord avec l'activité de piégeage du radical DPPH et les propriétés de réduction du fer. L'activité antioxydante est attribuée à plusieurs mécanismes parmi lesquels la décomposition du peroxyde et la réduction des radicaux libres ont été mentionnées par Maaroufi *et al.* (**2017**). La capacité des molécules antioxydantes à neutraliser l'H₂O₂ pourrait être attribuée aux caractéristiques structurales de ses composants actifs qui déterminent leur capacité à donner des électrons. La purification de l'H₂O₂ a été attribuée aux phénols grâce à leur capacité à lui donner des électrons et à sa

neutralisation sous forme d'eau par le processus appelé cycle eau-eau qui prend place dans les plantes (**Asada et al., 2000**).

Au contraire, l'extrait méthanolique dans la présente étude n'est pas apparemment un neuroprotecteur par rapport à l' H_2O_2 pour les mêmes concentrations testées (fig.58). Contrairement aux résultats de **Sujith et al. (2011)** qui ont montré que l'extrait méthanolique de *A. pyrethrum* L. était dans la capacité de piéger le peroxyde d'hydrogène de manière dose-dépendante ($IC_{50}=38.54 \mu\text{g/ml}$). Fait intéressant, l'extrait méthanolique, bien qu'il contienne une teneur en polyphénols plus élevée que l'extrait aqueux, ne semblait pas être neuroprotecteur dans ce modèle de stress oxydatif. L'extrait aqueux de cette plante contient une plus grande quantité de flavonoïdes que l'extrait méthanolique.

Les flavonoïdes exercent de multiples actions neuroprotectrices dans le cerveau, y compris un potentiel pour protéger les neurones contre les dommages induits par les neurotoxines, une capacité à supprimer la neuro-inflammation, et le potentiel de promouvoir la mémoire, l'apprentissage et la fonction cognitive (**Vauzour et al., 2008**). Ces effets semblent être soutenus par deux processus communs. Premièrement, ils interagissent avec des cascades de signalisations critiques de protéines et de lipides kinases dans le cerveau conduisant à une inhibition de l'apoptose déclenchée par des espèces neurotoxiques, et à une promotion de la survie neuronale et de la plasticité synaptique. Deuxièmement, ils induisent des effets bénéfiques sur le système vasculaire conduisant à des changements dans le flux sanguin cérébrovasculaire capable de provoquer l'angiogenèse, la neurogenèse et les modifications de la morphologie neuronale (**Vauzour et al., 2008**). La quercétine est un flavonoïde largement répandu dans les plantes. Des études in vitro sur des lignées de cellules neuronales et des neurones primaires avaient montré que, à des concentrations micromolaires, ces molécules sont antagonistes de la toxicité cellulaire induite par divers oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène, l'acide linoléique, l'hydro-péroxyde et d'autres molécules neurotoxiques induisant un stress oxydatif (**Costa et al., 2016**). La quercétine (100 mg/ml) exerçait un effet neuroprotecteur contre le stress oxydatif induit et les lésions neuronales causées par le peroxyde d'hydrogène de manière dose-dépendante. L'effet de cette molécule sur l'amélioration de la survie et de la viabilité neuronales était vraisemblablement lié à sa capacité antioxydante et à la prévention de la génération de ROS (**Haq et Al Amro, 2019**).

Tous les marqueurs biochimiques du stress oxydatif tels que la peroxydation lipidique, le dosage de l'enzyme GST, les dommages et la fragmentation de l'ADN ont été complètement inversés avec les prétraitements à la quercétine (**Haq et Al Amro, 2019**). Le stress oxydatif

accru induit par H₂O₂ dans les cellules cérébrales se reflétait dans les sections histologiques du cerveau colorées à la fois par la coloration hémalum et éosine et celle du bleu de toluidine.

Le bleu de toluidine est un colorant métachromatique basique de la thiazine qui a été utilisé préférentiellement pour étudier la modification de la morphologie des neurones dans différentes conditions expérimentales ou pathologiques (**Fernandez-Bueno *et al.*, 2012**). Les coupes tissulaires des cultures cérébrales témoins montraient des neurones normaux, des cellules gliales et des cellules pyramidales disposées en plusieurs couches. Le traitement avec le peroxyde d'hydrogène a montré une modification marquée de la morphologie des cellules gliales, nettement agrandies, ainsi qu'une pycnose nucléaire, une vacuolisation et une désintégration cytoplasmique. Le prétraitement à la quercétine montrait un effet protecteur remarquable sur la morphologie globale et la viabilité des cellules neuronales (**Haq et Al Amro, 2019**). Selon ces auteurs, lorsque ce flavonoïde réagit avec un radical libre, il donne un proton et devient lui-même un radical, mais l'électron non apparié résultant est délocalisé par résonance, ce qui le rend trop faible en énergie pour être réactif. D'autres études avaient montré que la rutine et l'isoquercitrine étaient capables d'antagoniser les modifications de l'expression des gènes induites par la 6-hydroxydopamine dans les cellules PC12 (**Magalingam *et al.*, 2015**). La protection des cellules neuronales par les flavonoïdes contre la toxicité de la bêta-amyloïde avait également été rapportée par Zhang *et al.* (**2016**). Les flavonoïdes tels que le flavanone tangeretin ont permis de maintenir l'intégrité et la fonctionnalité nigrostriatal suite à la lésion avec 6-hydroxydopamine, suggérant qu'il peut servir d'agent neuroprotecteur potentiel contre la pathologie sous-jacente associée à la maladie de Parkinson (**Dalta *et al.*, 2001**). L'utilisation d'extraits végétaux ou alimentaires riches en flavonoïdes avait montré des améliorations de la fonction cognitive, probablement en protégeant les neurones vulnérables, en améliorant la fonction neuronale existante ou en stimulant la régénération neuronale (**Youdim et Joseph, 2001**).

Dans le processus ischémique de l'AVC au niveau cellulaire. Les défaillances métaboliques mitochondriales initiales, entraînent une perturbation du fonctionnement de la pompe ionique au niveau de la membrane et une libération massive de neurotransmetteurs et de glutamate qui, à son tour, augmente l'entrée de Ca²⁺ et l'activation des enzymes (XO, NOS, COX, LOX kinases). La production d'espèces réactives d'oxygène et d'azote fait partie de ce processus, générant une peroxydation lipidique et des dommages à l'ADN nucléaire. Les flavonoïdes agissent en inhibant plusieurs étapes de ce processus (**Dajas *et al.*, 2003**). Cependant, Pour que les flavonoïdes puissent accéder au cerveau, ils doivent traverser d'abord la barrière hémato-encéphalique, qui contrôle l'entrée des xénobiotiques dans le cerveau. Des

flavanones telles que l'hespérétine, la naringénine et leurs métabolites *in vivo*, avaient traversé cette barrière dans des modèles pertinents *in vitro* et *in vivo* (Youdim *et al.*, 2004).

A ce jour, les traitements médicamenteux existants pour les troubles neurodégénératifs n'empêchent pas la dégénérescence sous-jacente des neurones et par conséquent, développer des stratégies alternatives capables d'empêcher la perte progressive de populations neuronales spécifiques semble être une meilleure alternative. Plusieurs études avaient prouvé le rôle neuroprotecteur de *A. pyrethrum* L. L'espèce a une activité neuropharmacologique potentielle en tant que nootrope. Elle possède des propriétés antidépressives (Sujith *et al.*, 2011). Des études suggéraient que l'extrait de racine de *A. pyrethrum* L. pourrait produire un effet antidépresseur par interaction avec les récepteurs adrénergiques et dopaminergiques, augmentant ainsi le niveau de noradrénaline et de dopamine dans le cerveau des souris (Badhe *et al.*, 2010). La plante avait été utilisée pour traiter les crises épileptiques et la paralysie (Annalakshmi *et al.*, 2012 ; Boonen *et al.*, 2012).

A. pyrethrum L. améliore la mémoire dans les modèles d'amnésie induite par la scopolamine en améliorant la neurotransmission cholinergique centrale (Sujith *et al.*, 2012). *A. pyrethrum* L. inhibe l'enzyme acétylcholinestrase et en élevant la concentration d'acétylcholine dans le cerveau homogénéisé et améliore la mémoire chez les rats. Ces résultats suggèrent le rôle neuroprotecteur possible de pyrèthre, il semble donc que *A. pyrethrum* L. puisse se révéler être utile comme agent anti Alzheimer au vu de sa capacité d'améliorer la mémoire (Sujith *et al.*, 2012 ; Ronald *et al.*, 2012). Sachant que le système cholinergique central, la transmission sérotoninergique et la noradrénaline jouent un rôle vital dans la fonction cognitive du cerveau, donc Akarkarha peut être considéré comme tonique du système nerveux selon Bendjeddou *et al.* (2003). Le pyrèthre avait été utilisé pour traiter la paralysie, l'hémiplégie, la céphalalgie, l'épilepsie et les rhumatismes dans la médecine traditionnelle (Prajapati *et al.*, 2003).

L'administration de l'extrait hydro-éthanolique de racine de pyrèthre prévient significativement les convulsions qui induisent le stress oxydatif et les troubles cognitifs d'une manière dose dépendante. La plante normalise aussi la diminution dans l'activité de la cholinestrase causée par les convulsions (Gautam *et al.*, 2011 ; Pahuja *et al.*, 2012). Zaidi *et al.* (2013) suggéraient une activité anticonvulsivante significative de l'extrait de racine de pyrèthre qui avait également montré un potentiel anxiolytique sans aucune neurotoxicité détectée. Les auteurs avaient conclu que l'effet anticonvulsivant améliore la neurotransmission GABAergique.

L'eugénol (4-allyl-2-méthoxyphénol, C₁₀H₁₂O₂), un composé terpénique aromatique, dont la présence était confirmée dans l'extrait de *A. pyrethrum* L., était susceptible d'expliquer l'activité anticonvulsivante observée dans cet extrait. Szabadics et Erdelyi (2000) avaient montré que l'eugénol bloquait la transmission synaptique chez l'escargot, *Helix pomatia* L., dans les neurones pré et post-synaptiques. Certaines études indiquent que l'eugénol possède un effet inhibiteur sur les événements liés à l'activation du récepteur NMDA et protège également les cellules neuronales contre les lésions oxydatives et excito-toxiques induites par l'NMDA. De plus, il protège les neurones de l'hippocampe de l'ischémie globale par la modulation des récepteurs NMDA et retarde également les convulsions induites par ce dernier.

Muller-Jakic *et al.* (1994) avaient testé une série d'alkylamides isolés à partir d'extraits de pyrethre. Tous inhibaient la cyclooxygénase, mais seuls quelques-uns inhibaient la 5-lipoxygénase. Le seul alkylamide de *A. pyrethrum* L. testé dans cette série, à savoir le deca-2E, 4E-dienoic acid tyramide, inhibe les deux enzymes avec des taux d'inhibition de 25% et 34% respectivement. Rimbau *et al.* (1996) avaient confirmé cet effet anti-inflammatoire des extraits aqueux, éthanoliques et chloroformiques de *Anacyclus* L. en inhibant la 5-lipoxygénase et en faisant appel à la médiation des prostaglandines.

En Inde, le tabac est souvent mâché avec un mélange de *A. pyrethrum* L. et de *Spilanthes calva* L. Les deux réduisaient le potentiel mutagène du tabac en inhibant la nitrosation (Boonen *et al.*, 2012). Il est admis que les composés actifs dans cette plante sont des alkylamides, en plus, une activité préventive modérée contre les dommages oxydatifs de l'ADN a été attribuée à l'extrait méthanolique de racine de cette drogue (kalim *et al.*, 2010). La LD₅₀ d'un extrait aqueux des racines de pyrèthre chez la souris a été estimée à 800 mg/kg et aucun effet mutagène n'a été observé (Sukumaran et Kuttan, 1995). Ce profil encourageant de l'extrait aqueux de *A. pyrethrum* L. mérite d'être approfondi en tentant d'identifier les constituants de cet extrait, responsables de cette activité.

Les extraits aqueux et méthanoliques des feuilles de *A. absinthium* L. n'avaient montré aucun effet neuroprotecteur ($p > 0.05$) sur les cellules CAD traitées au peroxyde d'hydrogène (fig. 59 et 60). Pourtant cette drogue possédait un historique long d'utilisation comme plante restauratrice du déclin des fonctions cognitives. Les praticiens de la médecine traditionnelle chinoise utilisaient cette plante pour traiter les maladies neurodégénératives (Parekh *et al.*, 2009). Cette espèce était utilisée dans la médecine traditionnelle libanaise contre les maladies neurologiques, dont la maladie d'Alzheimer (Salah et Jäger, 2004). Zeng *et al.* (2015) rapportaient que le dimer sesquiterpene Caruifolin D de *A. absinthium* L. supprimait considérablement la production intracellulaire des espèces réactives à l'oxygène, c'est ce qui la

rendait neuroprotectrice. Hallal *et al.* (2016) avaient signalé que le traitement avec *A. absinthium* L. montrait une amélioration significative de l'activité des enzymes antioxydantes, la superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion peroxydase, et protégeait aussi le cerveau du dysfonctionnement induit par le dichlorure de mercure (HgCl_2). Une étude avait été conçue pour étudier *in vivo* les effets protecteurs potentiels de *A. absinthium* L. (100 mg/kg et 200 mg/kg) sur le stress oxydatif cérébral ainsi que les perturbations comportementales induites par l'ischémie-reperfusion chez les rats (Bora et Sharma, 2010). Cette dernière provoque un dysfonctionnement mitochondrial et une diminution rapide de l'ATP, entraînant la génération de radicaux libres. Une production excessive de ROS peut causer des dommages cellulaires et la mort cellulaire ultérieure, car les ROS peuvent oxyder des composants cellulaires vitaux tels que les lipides, les protéines et l'ADN (Xi-Qiao *et al.*, 2008), et modifier plusieurs voies de signalisation qui en fin de compte, favorisent les dommages cellulaires et la mort au cours de l'ischémie-reperfusion cérébrale (Chan, 2001). Physiologiquement, la SOD réagit avec $\text{O}_2^{\bullet-}$ pour former H_2O_2 ; la CAT et le GSH participent à la détoxification de l' H_2O_2 (Bora et Sharma, 2010). La réduction du volume de l'infarctus cérébral et du stress oxydatif, la restauration des antioxydants endogènes et l'amélioration significative des résultats comportementaux lors d'une ischémie-reperfusion témoignaient toutes de la neuroprotection de cet extrait. Le mécanisme par lequel *A. absinthium* L. normalisait les dommages, inhibait la peroxydation lipidique et les déficits neurologiques et restaurait les enzymes de défense antioxydants endogènes est probablement dû à ses propriétés antioxydantes (Bora et Sharma, 2010).

De plus, l'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène *in vitro* par l'extrait méthanolique d'absinthe, indiquait qu'il a été capable de piéger le peroxyde d'hydrogène d'une manière dépendante de la concentration ($\text{EC}_{50}=106.41 \mu\text{g/ml}$) (Bora et Sharma, 2011). Ces résultats sont en accord avec ceux de Mahmoudi *et al.* (2009), dont les extraits présentaient une bonne activité de piégeage de l' H_2O_2 ($\text{IC}_{50} = 0.243 \pm 12,15 \text{ mg/ml}$) d'une façon dose dépendante. Le piégeage d' H_2O_2 par l'extrait des parties aériennes de *A. absinthium* peut être attribué à leurs composés phénoliques, qui peuvent donner des électrons au peroxyde d'hydrogène, le neutralisant ainsi en eau selon ces auteurs.

Les travaux menés par Craciunescu *et al.* (2012) afin d'évaluer la capacité de l'extrait éthanolique d'absinthe à réduire le stress oxydatif dans les fibroblastes traités par H_2O_2 ($50\mu\text{M}$) ont révélé une diminution de la viabilité des fibroblastes à environ 50% et le prétraitement des cellules NCTC avec l'extrait d'absinthe (100–500 mg/l) avait inversé de manière significative la cytotoxicité induite par H_2O_2 . Les résultats du test au rouge neutre avaient présenté des valeurs comprises entre 75 et 88,9% de viabilité cellulaire, significativement ($p<0,01$)

supérieures au groupe traité avec H₂O₂ seul. La meilleure protection cellulaire, exprimée en valeurs de viabilité cellulaire, avait été observée pour le prétraitement avec 10–300 mg/l d'absinthe. On supposait que l'H₂O₂ pouvait induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 / M, par l'expression d'un inhibiteur de la kinase dépendante de la cycline (Seomun *et al.*, 2005). Les données avaient démontré que les extraits de *A. absinthium* L. protégeaient les cellules NCTC contre les dommages oxydatifs, soutenaient la prolifération cellulaire et ne présentaient aucune altération du cycle cellulaire causée par le stress oxydatif induit par H₂O₂ (Craciunescu *et al.*, 2012). Les cellules traitées avec H₂O₂ semblaient dégénérées et lysées. Une morphologie cellulaire altérée et une densité cellulaire diminuée, indiquaient un effet dommageable. D'autre part, les cellules prétraitées avec 10-300 mg/l d'extrait d'absinthe ne présentaient pas de modification morphologique d'après ces auteurs.

Malgré la grande disparité qui existait entre l'effet neurotoxique et neuroprotecteur de cet extrait, ces auteurs suggéraient que *A. absinthium* L. est neuroprotectrice et pourrait s'avérer utile dans le traitement des accidents vasculaires cérébraux. D'après Lachenmeier (2010), il se pourrait bien que le thuyone, une substance neurotoxique, soit éliminé au cours de la préparation relativement prolongée de l'extrait d'absinthe, qui comprenait le séchage et le broyage des parties de la plante, suivis de l'extraction méthanolique au Soxhlet, de l'évaporation sous vide et de la lyophilisation. Et que par conséquent, les limites de l'étude font que les effets neuroprotecteurs ne s'appliquent pas à l'absinthe en elle-même, mais seulement à l'extrait préparé de cette manière spécifique. Par ailleurs, la plante est approuvée par la Commission E Allemande pour le traitement des patients souffrant de dyspepsie, de perte d'appétit et de dyskinésie biliaire (Blumenthal *et al.*, 1998). Bien que largement utilisé, il n'y a pas de dose standard pour l'absinthe (Yarnell et Abascal, 2013). Elle est couramment utilisée sous formes de thé, de poudre et de capsule. En pratique générale, une ou deux cuillerées à thé de feuilles sèches de *A. Absinthium* L. bouillies dans l'eau sont utilisées pour ses effets digestifs et anxiolytiques (Altunkaynak *et al.*, 2017). En plus, l'extrait éthanolique de *A. absinthium* L. renforce l'excroissance des neurites en potentialisant le facteur de croissance et les cellules PC12 (Li et Ohizumi, 2004), il possède une activité sur les récepteurs nicotiques et muscariniques des cellules corticales humaines (Wake *et al.*, 2000).

L'herbe pourrait être bénéfique pour le traitement des altérations de la glie et des neurones observées au cours d'une intoxication chronique au plomb chez les rats (Parekh *et al.*, 2009). Selon Orhan *et al.* (2010) *A. absinthium* L. (100 g/ml) présente un pouvoir d'inhibition de l'acétylcholinestérase de $17.64 \pm 2.28\%$ et par conséquent peut avoir un effet

bénéfique chez les patients atteints de l'Alzheimer. L'absinthe est aussi antidépressive (**Mahmoudi et al., 2009**).

Aucune activité neuroprotectrice vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène n'a été constatée chez les cellules CAD traitées simultanément avec les deux extraits de *U. urens* L. (fig. 61 et 62). Pourtant, dans une étude récente menée par Barkaoui *et al.* (**2017**), les auteurs affirmaient que l'extrait avait un excellent pouvoir antioxydant contre H₂O₂. Pendant l'expérimentation, l'extrait aqueux de *U. urens* L. (3mg/kg) avait été administré à des rats albinos, suivi d'une injection intra-péritonéale de 1mM H₂O₂. L'évaluation biochimique du traitement avait été testée à différents niveaux enzymatiques, tels que le glutathion (GSH), la superoxyde dismutase (SOD) et la peroxydation lipidique (MDA). Le dosage des antioxydants avait montré une augmentation du GSH et de la SOD. Des signes cliniques et des lésions histologiques ont été rarement observées chez les souris traitées (**Barkaoui et al., 2017**). Une diminution significative du taux de MDA avait également été signalée par Romojaro *et al.* (**2013**), la capacité de l'extrait d'ortie à éliminer H₂O₂ était de 81.41 %. Le peroxyde d'hydrogène est un agent chimique sélectivement toxique. Il induit la synthèse des ROS et / ou diminue les mécanismes de défense antioxydants (**Whaley-Connell et al., 2011**). Cependant, l'augmentation de la sécrétion de ROS s'est révélée être une cause importante dans différentes maladies. Il est de plus en plus évident que H₂O₂ directement ou indirectement peut agir comme une molécule messagère dans la synthèse et l'activation de plusieurs médiateurs de l'inflammation. Ces radicaux hydroxyles ont la capacité de rejoindre les nucléotides dans l'ADN et de provoquer la rupture des brins, contribuant à la cancérogenèse, la mutagenèse et la cytotoxicité. De plus, cette espèce est considérée comme l'un des initiateurs rapides du processus de peroxydation lipidique en raison de l'abstraction des atomes d'hydrogène à partir d'acides gras insaturés (**Romojaro et al., 2013**).

Dans une autre étude, l'efficacité de l'extrait méthanolique d'ortie (100 à 400 mg/kg) a été comparée à celle du médicament anxiolytique standard, le diazépam (1 mg/kg). Les résultats corroborent l'activité anxiolytique de *U. urens* L., conformément à son utilisation traditionnelle à des fins médicinales, et peuvent également suggérer un meilleur profil d'effets secondaires de cette plante par rapport au diazépam (**Doukkali et al., 2015**).

5.6. Essai d'imagerie du calcium

La plasticité du système nerveux est régulée par un équilibre fonctionnel entre les processus de croissance/régénération et de décroissance/dégénérescence. La concentration de calcium principalement intracellulaire [Ca²⁺]_i joue un rôle clé dans la régulation de la direction

de cet équilibre fonctionnel. Il existe également une interaction systématique entre l'étendue de la perturbation du calcium et la durée de la dérégulation. Par conséquent, tout dysfonctionnement de l'homéostasie du Ca^{2+} peut expliquer les changements liés à l'âge et aux maladies neurodégénératives.

Les ions calcium (Ca^{2+}) génèrent une multitude de signaux intracellulaires qui contrôlent l'expression des gènes et des fonctions clés, telles que la libération de neurotransmetteur par les vésicules synaptiques, la fonction neuronale et la plasticité synaptique. Mais, paradoxalement, un influx trop important de Ca^{2+} dans les cellules peut causer leur endommagement. La source du calcium intracellulaire pourrait être une combinaison de canaux calciques voltage-dépendants (VGCC), de récepteurs NMDA, de réserves de calcium du RE intracellulaires et/ou de mitochondries (**Brini et al., 2014**). Dans la cellule, la concentration en calcium est hautement dynamique en raison de la présence de canaux qui transportent sélectivement ces ions en réponse à divers signaux. Par conséquent si, à la suite d'une dépolarisation ou tout autre stimuli, un extrait végétal empêcherait l'augmentation excessive de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les neurones par son entrée à travers ces canaux, cela contribuerait à l'action neuroprotectrice de cet extrait. C'est dans ce sens que notre étude avait été dirigée et l'effet des extraits aqueux et méthanoliques des racines de *Anacyclus pyrethrum* L., des feuilles de *Arthemisia absinthium* L. et de *Urtica urens* L., sur les concentrations intracellulaires de Ca^{2+} libre dans des cellules neuronales cultivées de souris CAD, avant et durant la dépolarisation au KCl, avaient été observés. À cette fin, la technique d'imagerie numérique et la photométrie du calcium à base de fura-2, avait été utilisée. Cette technique est extrêmement utile pour investir les différents rôles, que joue le Ca^{2+} , dans le fonctionnement des neurones. Lee et al. (2013), avaient constaté qu'une augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pouvait être obtenue, en appliquant du KCl aux cellules neuronales de l'hippocampe de rats. Ceci est en accord avec l'hypothèse de Zundorf et Reiser (2011), qui confirmaient que, dans des conditions physiologiques, des impulsions électriques ou des stimuli reçus par les récepteurs neuronaux génèrent différents signaux de Ca^{2+} avec des dimensions spatiales, une extension temporelle, une amplitude, une localisation subcellulaire et, dans certains cas, des oscillations distinctes. Le signal calcium apparaît actuellement comme l'un des facteurs déterminants intervenant dans la transduction intracellulaire d'un stimulus extracellulaire. Ce signal possède une dynamique spatiotemporelle très complexe qui allie rapidité de propagation et retour à l'état initial dans un délai très bref (**Humbert et al., 1995**). L'essai de mobilisation du calcium est le test fonctionnel le plus largement utilisé pour les systèmes de culture de cellules neuronales. L'imagerie du calcium est une technique extrêmement utile pour étudier la

variété des rôles des ions calcium dans les neurones en fonctionnement. Le nombre des cellules CAD, étudiées à chaque expérience, était égal à dix (n=10).

5.6.1. Signalisation fonctionnelle des extraits aqueux et méthanoliques de *A. pyrethrum* L. utilisant l'imagerie du calcium

L'extrait aqueux de *Anacyclus pyrethrum* L. (0,1 mg/ml) était le seul des six extraits à générer une petite réponse fonctionnelle significative avec une légère augmentation du $[Ca^{2+}]_i$. L'extrait méthanolique de *Anacyclus*, d'autre part, n'a eu aucun effet sur la concentration de $[Ca^{2+}]_i$. En outre, cet extrait aqueux semblait également augmenter l'effet de dépolarisation par rapport au témoin, contrairement à l'extrait au méthanol qui, pour sa part, supprimait considérablement cette réponse.

5.6.1.1. Effet des extraits aqueux et méthanolique de *A. pyrethrum* L. sur la mobilisation du calcium dans les cellules CAD au moment de l'injection de l'extrait

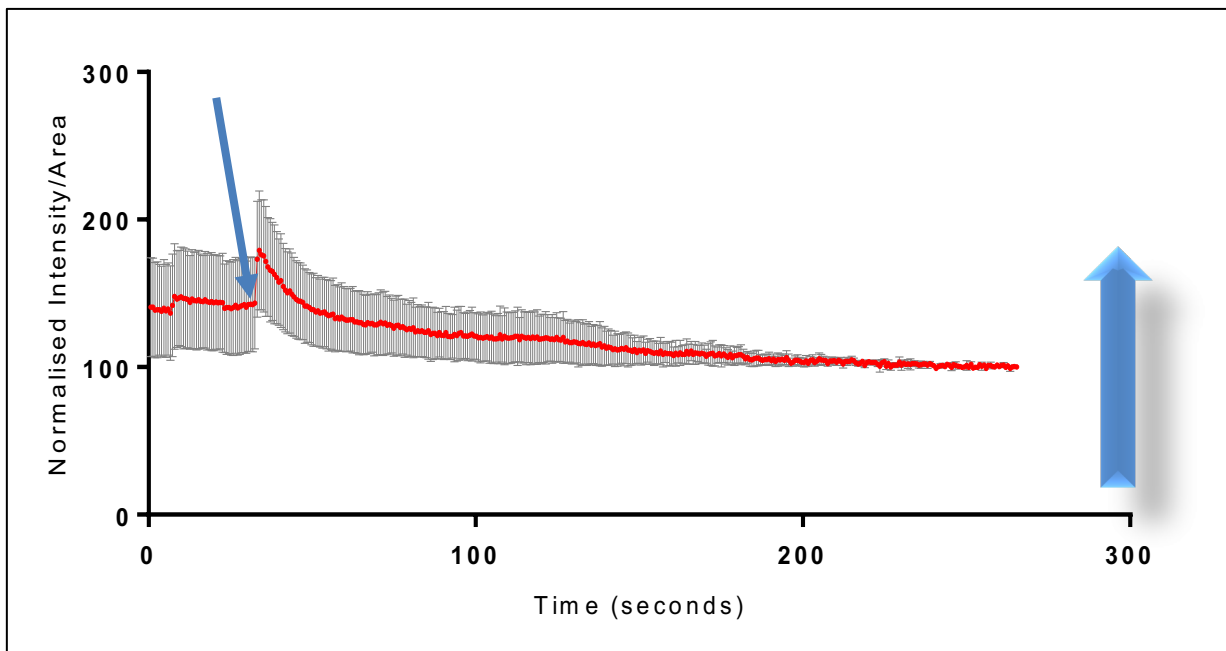


Figure 63. Extrait aqueux de *A. pyrethrum* L. Le moment de l'injection de l'extrait est la trente deuxième seconde (32s).

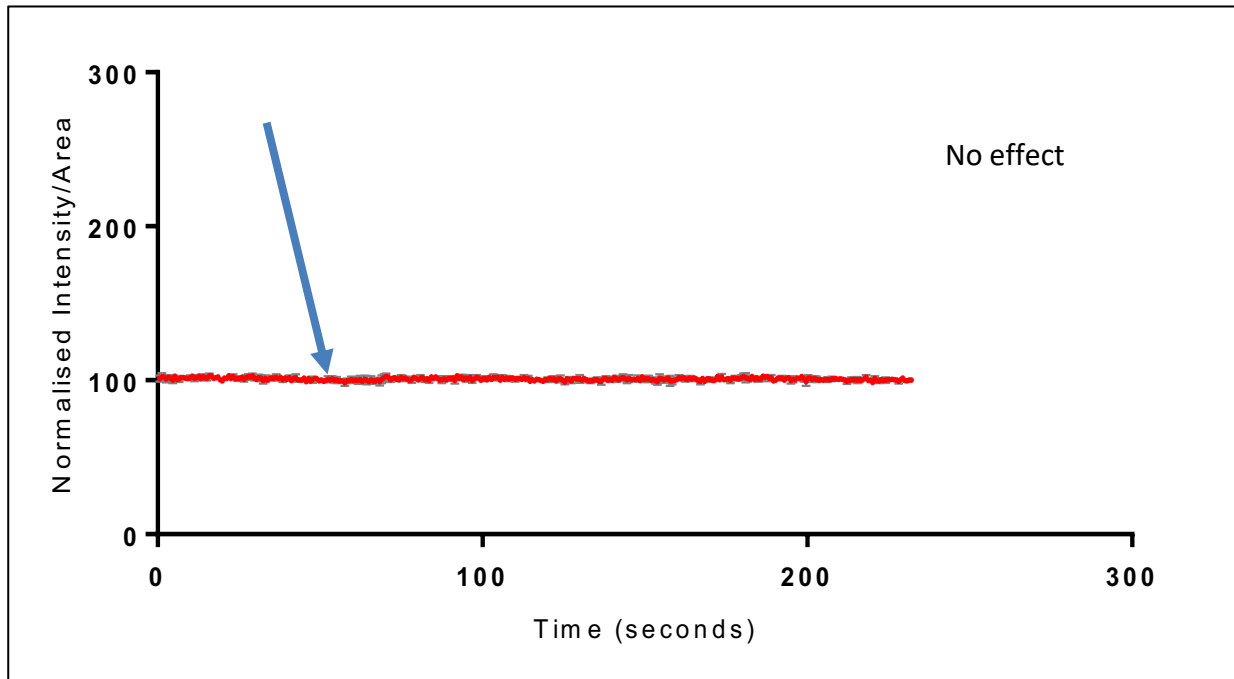


Figure 64. Extrait méthanolique de *A. pyrethrum* L. Le moment de l'injection de l'extrait est la cinquante deuxième seconde (52s).

5.6.1.2. Effet des extraits aqueux et méthanolique de *A. pyrethrum* L. sur la mobilisation du calcium durant la dépolarisation (50 mM KCl) des cellules CAD

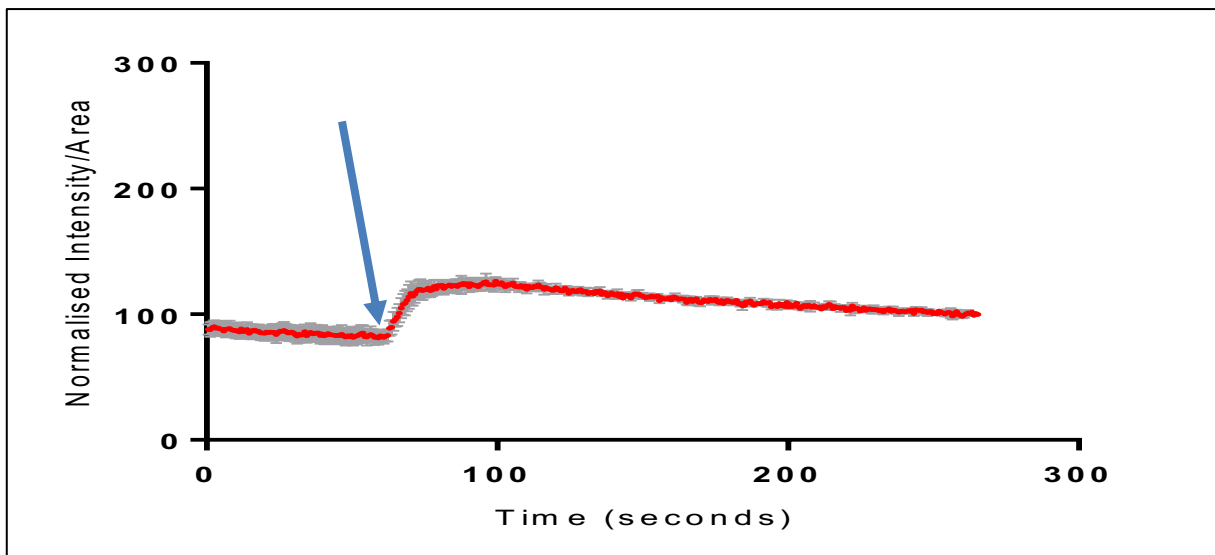


Figure 65. Dépolarisation des cellules CAD control. Le moment de la dépolarisation est la cinquante huitième seconde (58s). Une durée de réponse égale à 200 secondes et un pic de l'intensité/surface égale à 25 % par rapport à la ligne de base.

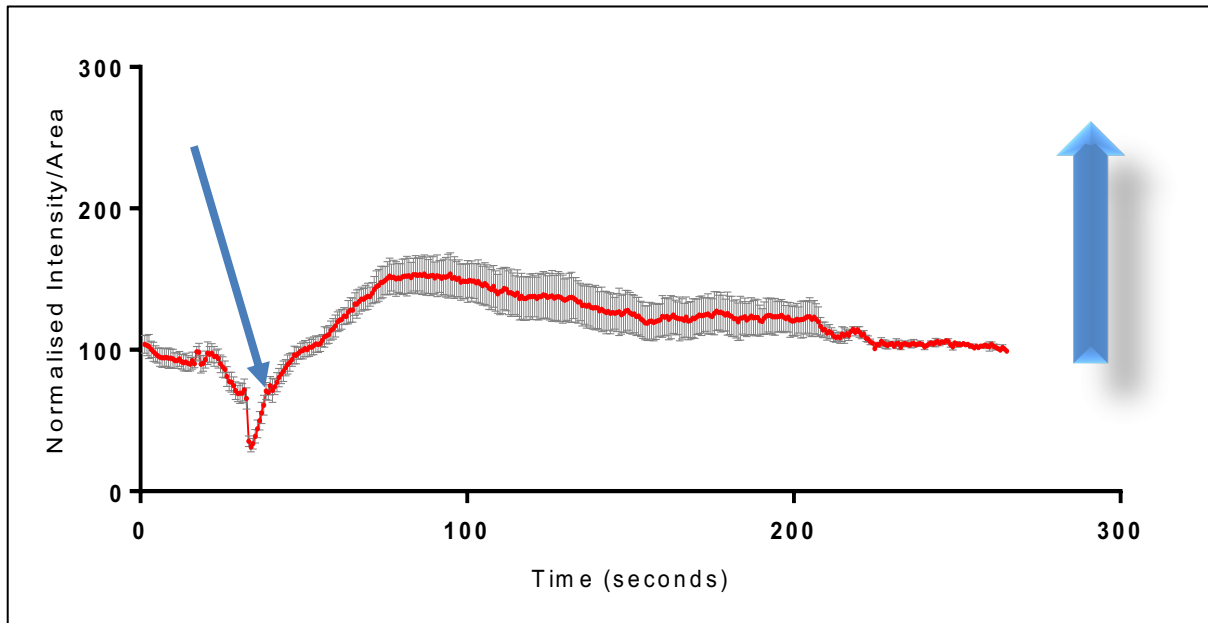


Figure 66. Dépolarisation en présence de l'extrait aqueux de *A. pyrethrum* L. Le moment de la dépolarisation est la quarante quatrième seconde (44s). Une durée de réponse supérieure à 220 secondes et un pic de l'intensité/surface égale à 50 % par rapport à la ligne de base.

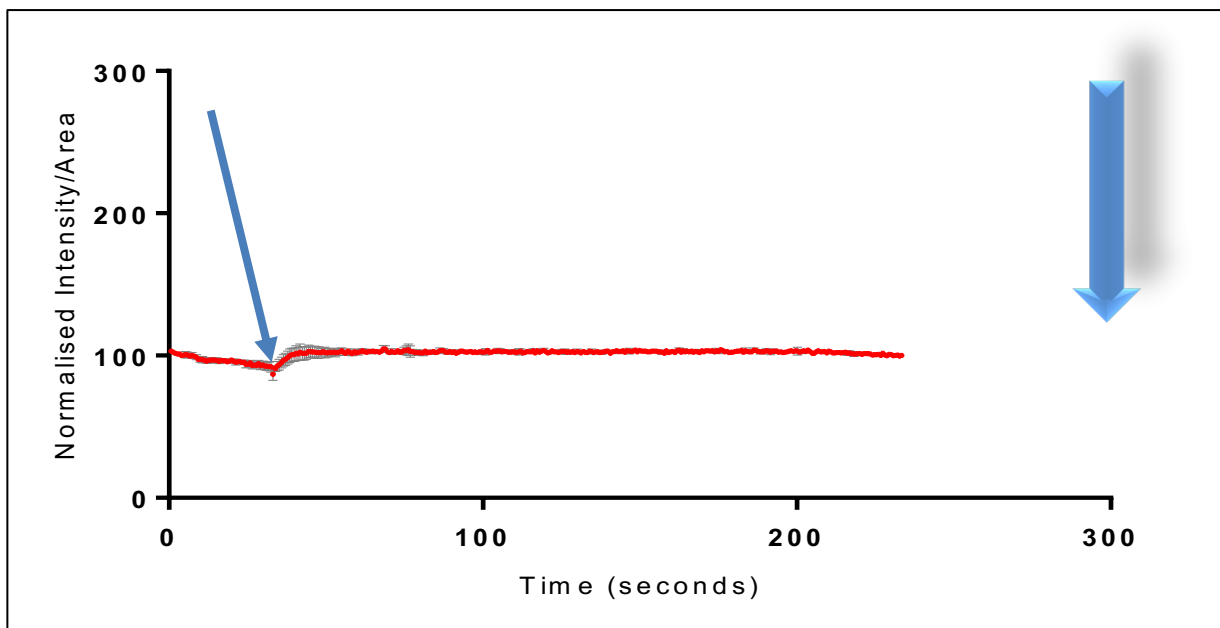


Figure 67. Dépolarisation en présence de l'extrait méthanolique de *A. pyrethrum* L. Le moment de la dépolarisation est la trentième seconde (30s). Une durée de réponse de 5 secondes et un pic de l'intensité/surface égale à peu près à 5 % par rapport à la ligne de base.

5.6.2. Signalisation fonctionnelle des extraits aqueux et méthanoliques de *A. absinthium* L. utilisant l'imagerie du calcium

Les extraits aqueux et méthanoliques de *A. absinthium* L. (0,1 mg/ml) ne semblaient avoir aucun effet sur la réponse $[Ca^{2+}]_i$. Cependant, les extraits aqueux et méthanoliques (0,1 mg/ml) ont totalement supprimé la réponse à la dépolarisation, induite par KCl, par rapport au contrôle.

5.6.2.1. Effet des extraits aqueux et méthanolique de *A. absinthium* L. sur la mobilisation du calcium dans les cellules CAD au moment de l'injection de l'extrait

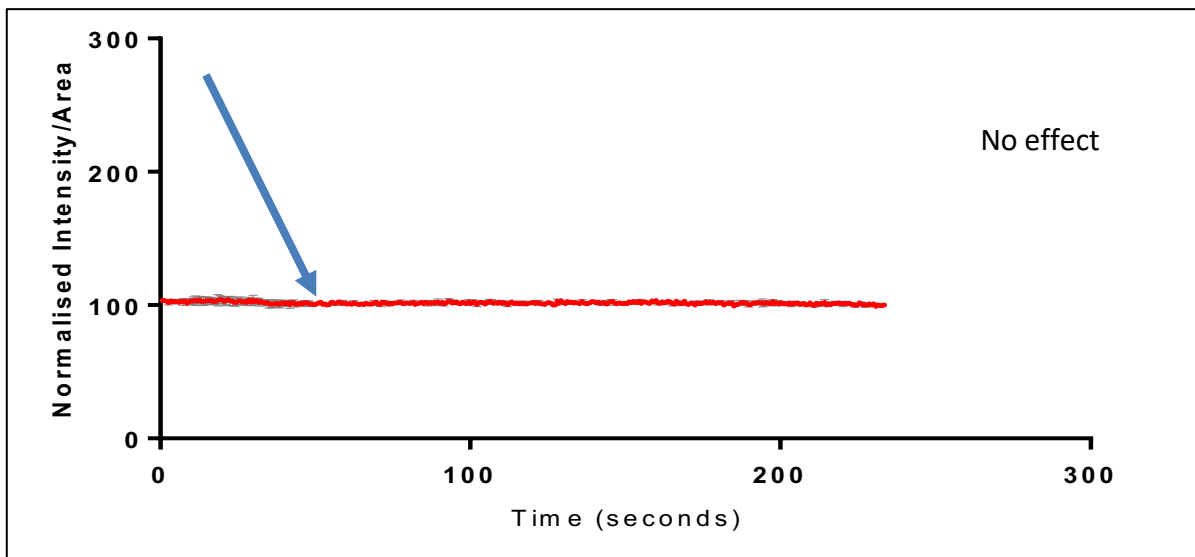


Figure 68. Extrait aqueux de *A. absinthium* L. Le moment de l'injection de l'extrait est la cinquante troisième secondes (53s).



Figure 69. Extrait méthanolique de *A. absinthium* L. Le moment de l'injection de l'extrait est la cinquante et unième seconde (51s).

5.6.2.2. Effet des extraits aqueux et méthanolique de *A. absinthium* L. sur la mobilisation du calcium durant la dépolarisation (50 mM KCl) des cellules CAD

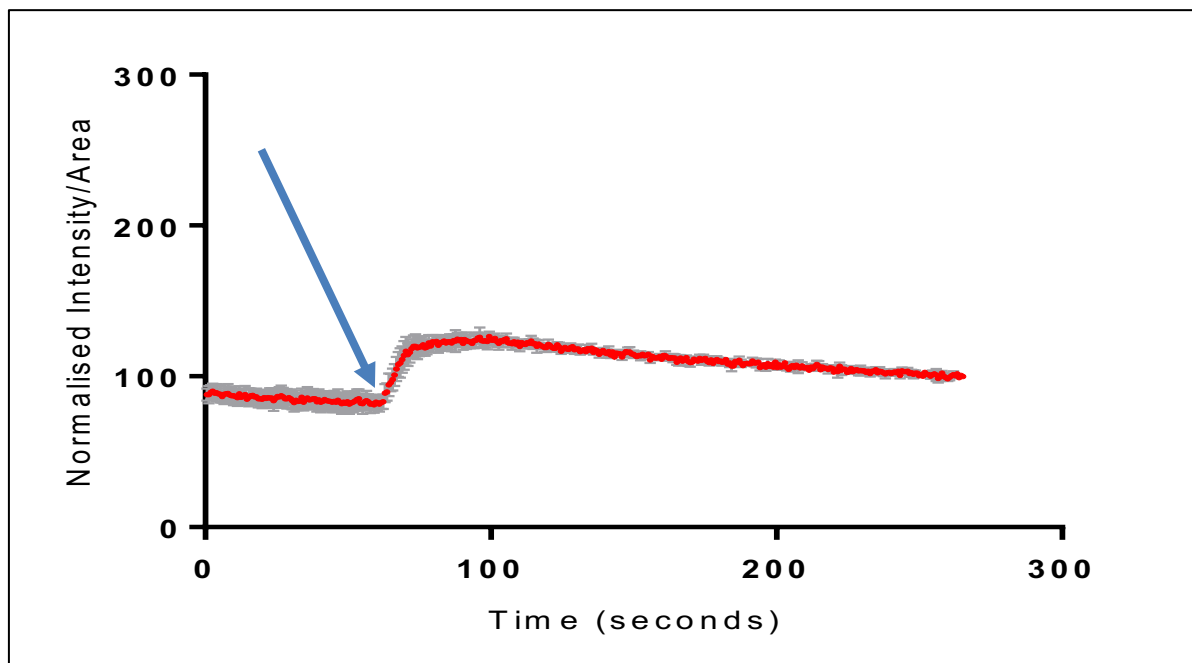


Figure 70. Dépolarisation du control. Le moment de la dépolarisation est la cinquante huitième seconde (58s). Une durée de réponse égale à 200 secondes et un pic de l'intensité/surface égale à 25 % par rapport à la ligne de base.

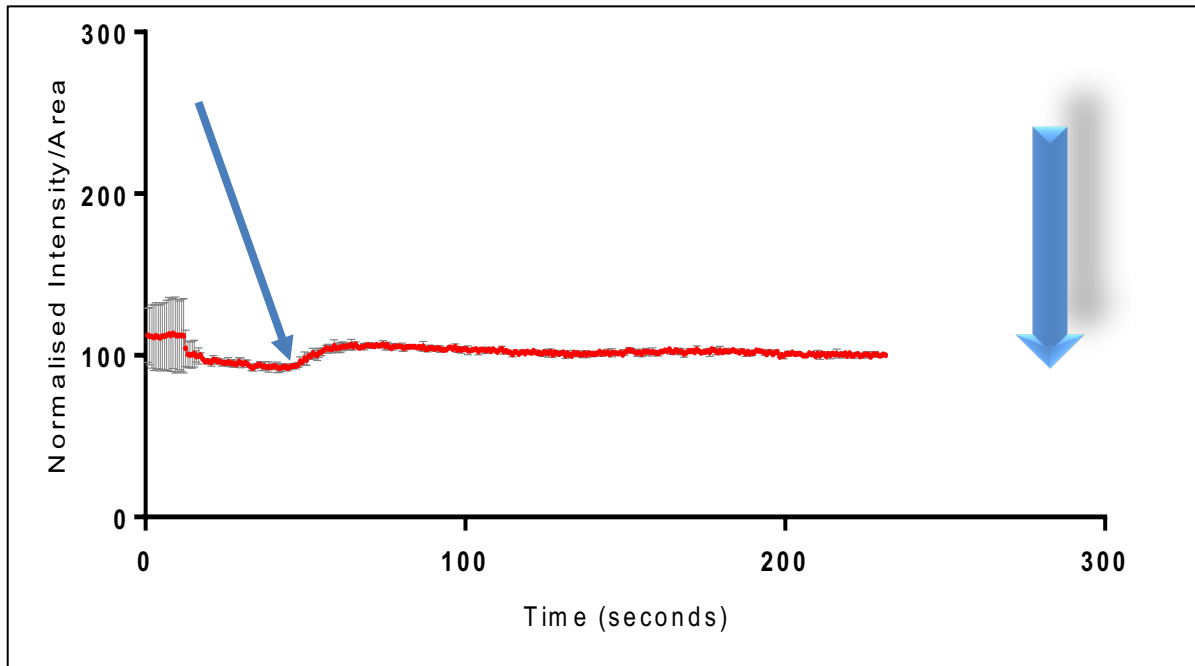


Figure 71. Dépolarisation en présence de l'extrait aqueux de *A. absinthium* L. Le moment de la dépolarisation est la cinquantième seconde (50s). Une durée de réponse égale à 50s et un pic d'intensité / surface égal à 5% par rapport à la ligne de base.

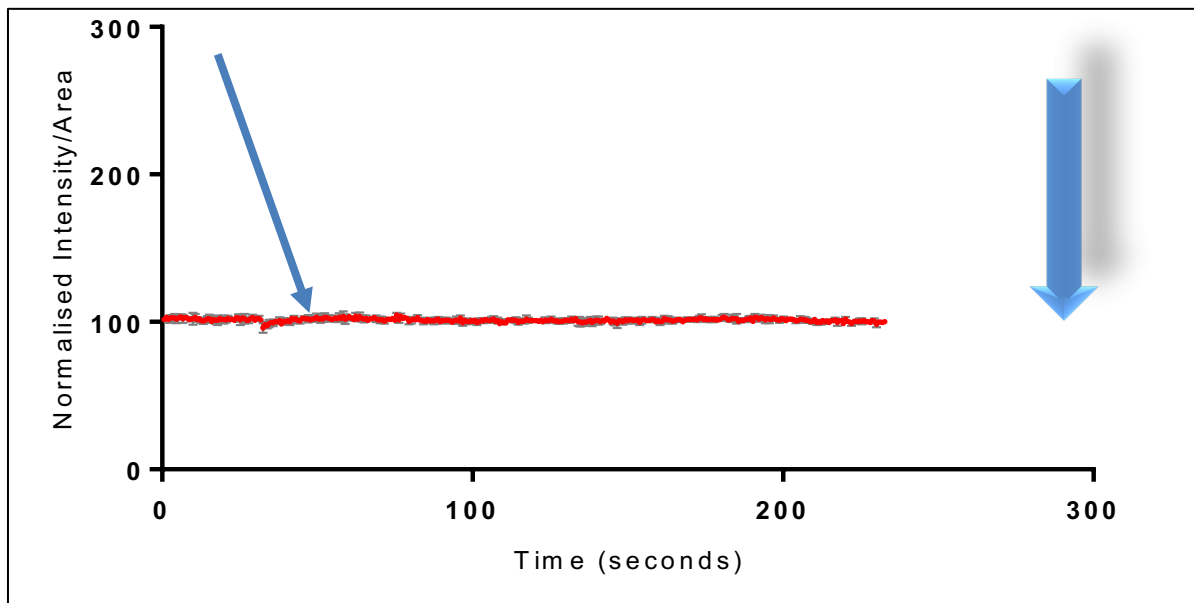


Figure 72. Dépolarisation en présence de l'extrait méthanolique de *A. absinthium* L. Le moment de la dépolarisation est la cinquante deuxième seconde (52s). Aucune réponse et un pic d'intensité/surface égal à 0% par rapport à la ligne de base.

5.6.3. Signalisation fonctionnelle des extraits aqueux et méthanoliques de *U. urens* L. utilisant l'imagerie du calcium

L'extrait aqueux de *U. urens* L. (0,1 mg/ml) a généré une réponse fonctionnelle modeste avec une légère diminution du $[Ca^{2+}]_i$ après 10 secondes d'injection. D'autre part, ce même extrait a fortement réduit la réponse à la dépolarisation induite par KCl également en environ 10 secondes. En comparant avec le témoin, l'extrait méthanolique de *U. urens* L. (0.1mg/ml) n'a eu aucun effet sur la $[Ca^{2+}]_i$; mais il a eu un effet biphasique sur le contenu en calcium suite à la dépolarisation.

5.6.3.1. Effet des extraits aqueux et méthanolique de *U. urens* L. sur la mobilisation du calcium dans les cellules CAD au moment de l'injection de l'extrait

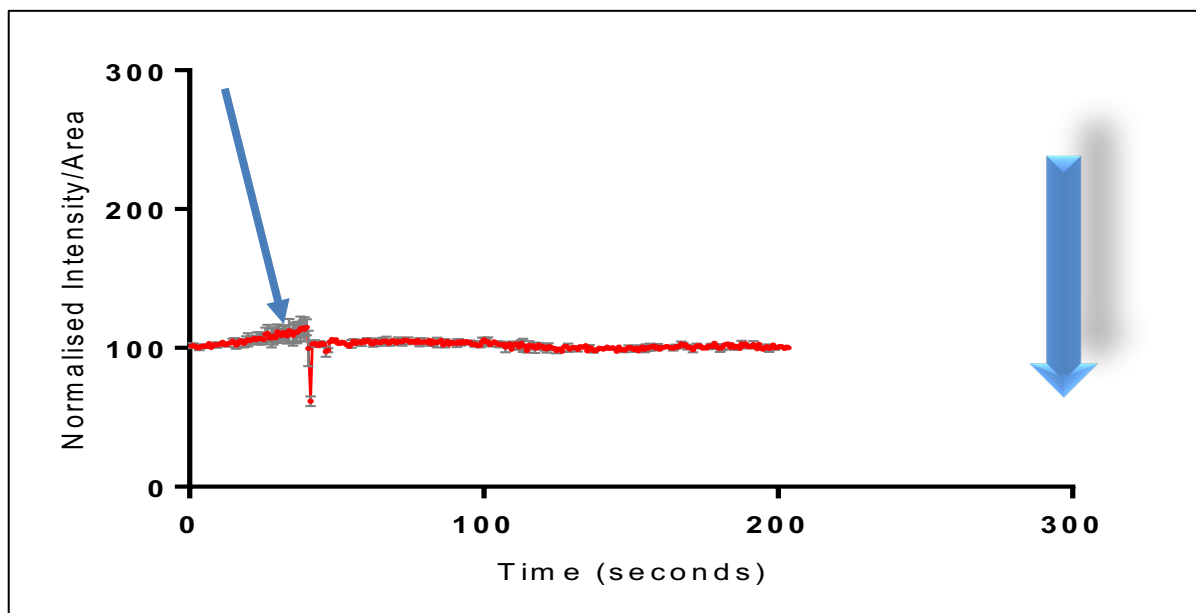


Figure 73. Extrait aqueux de *U. urens* L. Le moment de l'injection de l'extrait est la trente troisième seconde (33s).

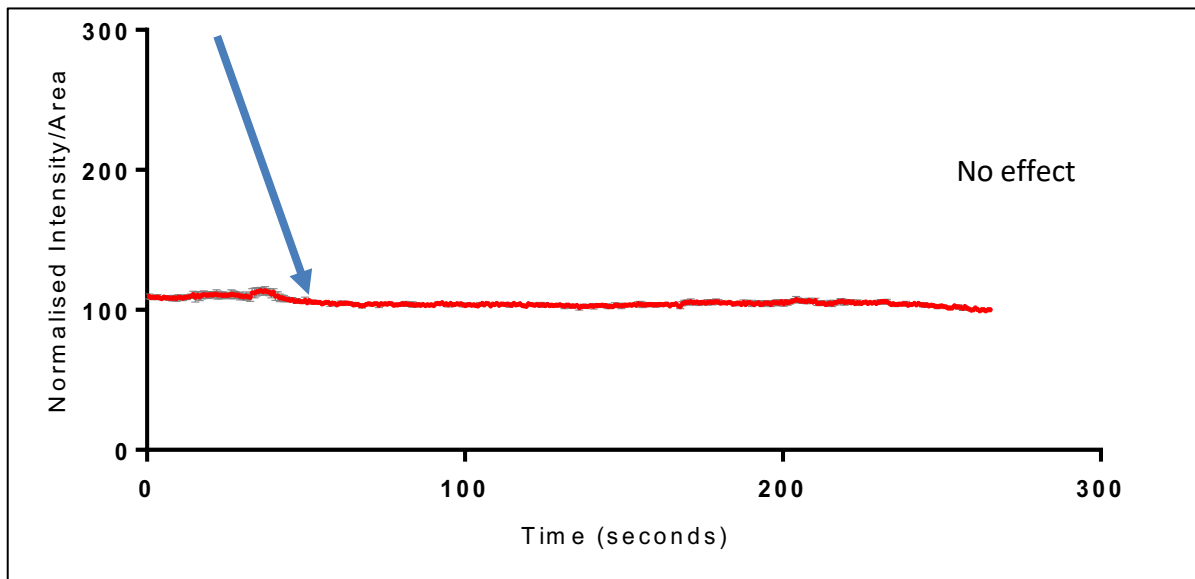


Figure 74. Extrait méthanolique de *U. urens* L. Le moment de l'injection de l'extrait est la cinquantième secondes (50s).

5.6.3.2. Effet des extraits aqueux et méthanolique de *U. urens* L. sur la mobilisation du calcium durant la dépolarisation (50 mM KCl) des cellules CAD

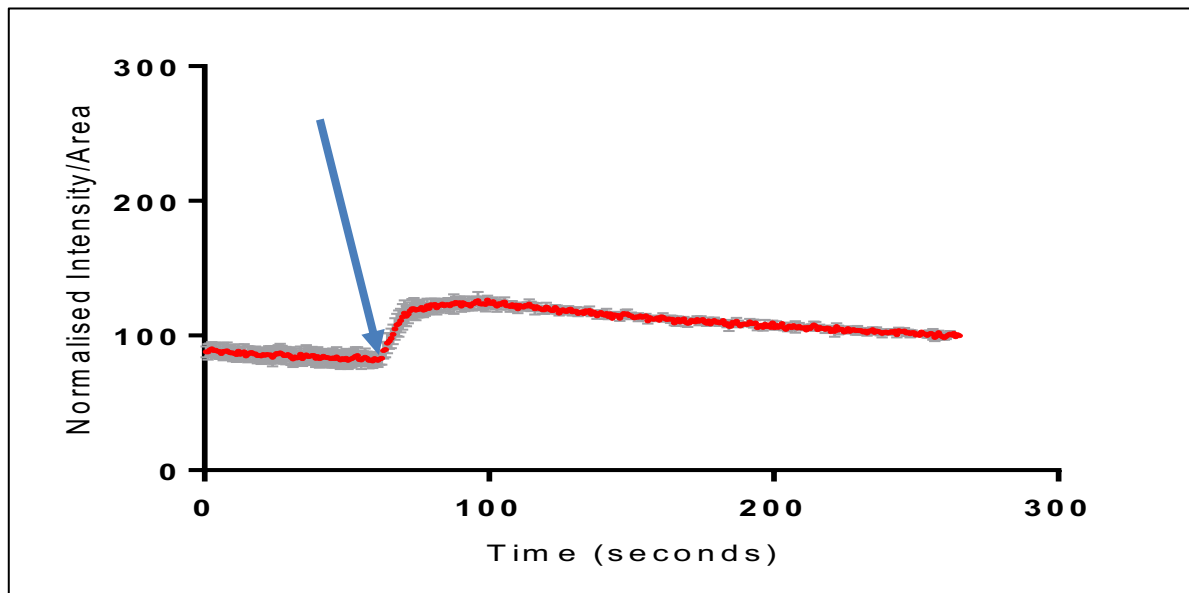


Figure 75. Dépolarisation du control. Le moment de la dépolarisation est la cinquante huitième seconde (58s). Une durée de réponse égale à 200 secondes et un pic de l'intensité/surface égale à 25% par rapport à la ligne de base.

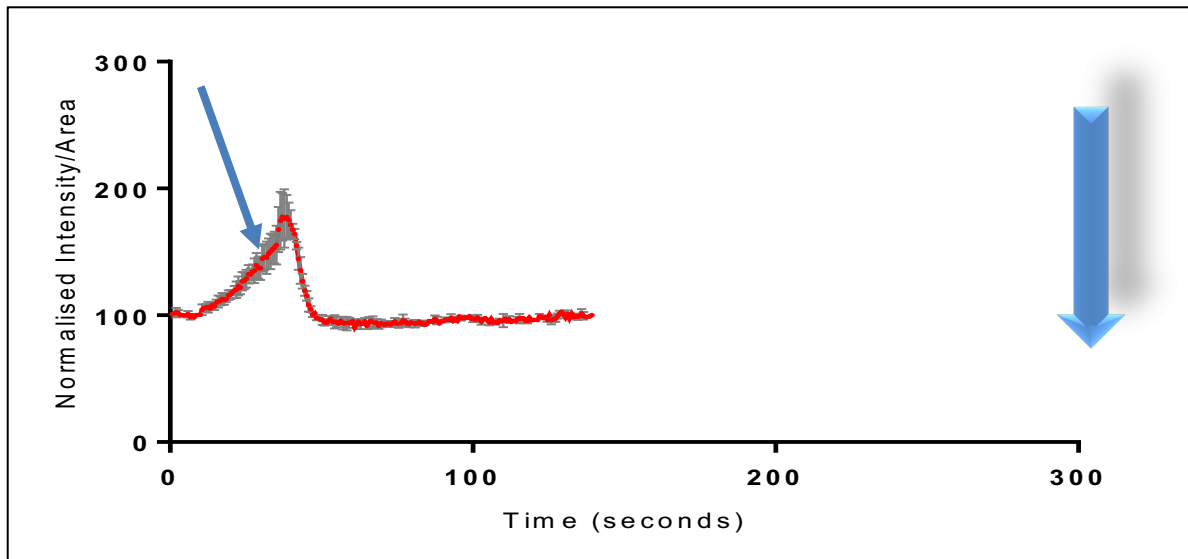


Figure 76. Dépolarisation en présence de l'extrait aqueux de *U. urens* L. Le moment de la dépolarisation est la trente deuxième secondes (32s). Une durée de réponse égale à 18 secondes et un pic de l'intensité/surface égale à 25% par rapport à la ligne de base.

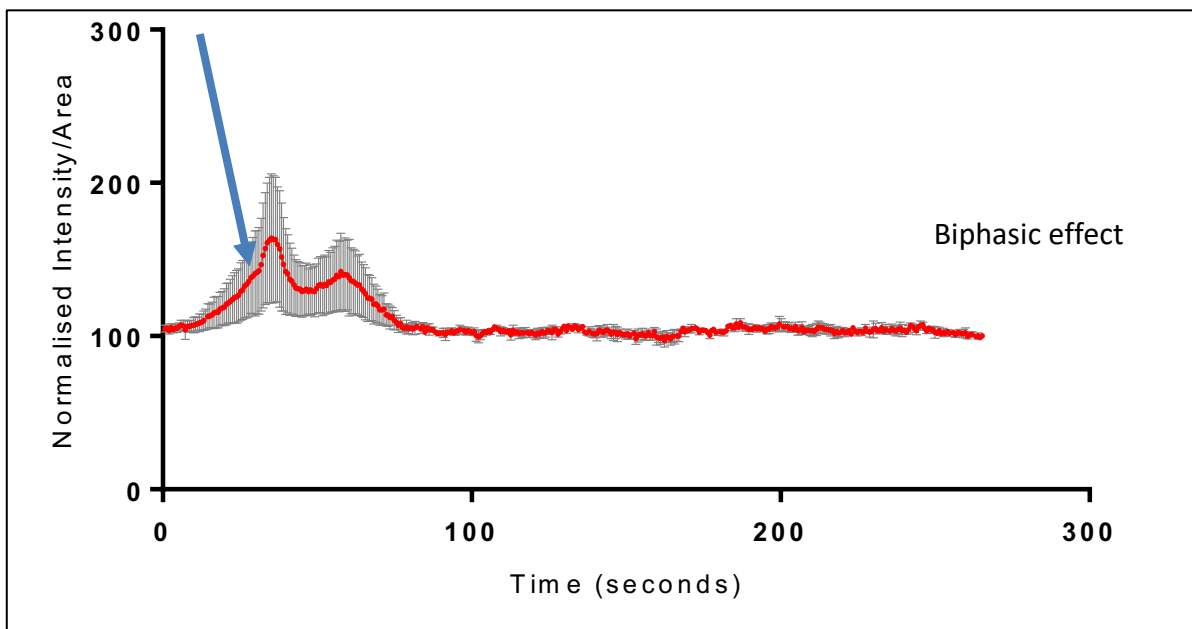


Figure 77. Dépolarisation en présence de l'extrait méthanolique de *U. urens* L. Le moment de la dépolarisation est la vingt deuxième seconde (22s). Une durée de réponse égale à 54 secondes. Un premier pic d'intensité/surface égale à 25% et un deuxième pic d'intensité/surface égale à 15% par rapport à la ligne de base.

Par rapport au témoin (fig. 65), l'extrait aqueux de *A. pyrethrum* L. (0.1mg/ml), était le seul des six extraits à générer une petite réponse fonctionnelle avec une modeste augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ après seulement 2 secondes de son injection (fig. 63). Par contre l'extrait méthanolique de pyrèthre n'avait aucun effet sur la concentration intracellulaire du calcium (fig. 64). Cependant, l'extrait aqueux de *A. pyrethrum* L. semblait augmenter l'effet de la dépolarisation (fig. 66) contrairement à l'extrait au méthanol qui a, quant à lui, considérablement supprimé cette réponse (fig. 67).

Contrairement à l'extrait méthanolique qui avait significativement supprimé la réponse à la dépolarisation, l'extrait aqueux semblait étendre cette dernière. Les cellules CAD traitées avec un extrait aqueux de pyrèthre produisaient un effet de dépolarisation plus important (environ 50%) supérieur à celui du contrôle (environ 25%). Il est possible que l'extrait aqueux, en augmentant la réponse dépolarisante, puisse augmenter de façon différentielle la libération de neurotransmetteurs inhibiteurs, par exemple le GABA, ce qui peut expliquer la capacité neuroprotectrice de cet extrait. De plus, un temps de réponse égal à 200 secondes pour le contrôle contre 220 secondes pour l'extrait aqueux de pyrèthre a été observé. Ce dernier aspect est peut-être aussi lié à sa propriété neuroprotectrice. L'extrait aqueux de *A. pyrethrum* L., avait peut-être retardé l'entrée du calcium en rendant inactifs, d'une façon transitoire, les canaux calcium dépendants du voltage (VGCC), les excitateurs des récepteurs NMDA et/ou en empêchant la libération de cet ion depuis les réserves intracellulaires telles que le réticulum endoplasmique ou les mitochondries ou bien en entravant momentanément la dépolarisation membranaire en agissant sur les canaux Na^+ et K^+ . D'après Zündorf et Reiser (2011), les stimuli induisent l'entrée de Ca^{2+} externe via les canaux Ca_v , les canaux TRP et ROC. Parallèlement, l'activation des GPCR induit la synthèse de seconds messagers tels que l'InsP₃ et la ryanodine. Ces derniers, en se fixant sur leurs récepteurs, InsP₃R et RyR respectivement, induiraient la libération de Ca^{2+} interne depuis le RE ou depuis d'autres compartiments cellulaires. Cette dernière voie est également activée par l'influx de calcium (Zündorf et Reiser, 2011). Ces résultats ressemblaient à ceux de Bautista *et al.* (2005), qui avaient constaté que 30% des cellules humaines (HEK293t) présentaient des augmentations significatives du calcium intracellulaire libre après l'application d'extrait d'ail et que toutes les réponses ont été éliminées par coapplication du bloqueur de canaux TRPA1 non sélectif ; le rouge de ruthénium. Ces auteurs suggéraient que les canaux calcium de type TRP pouvaient être activés par cet extrait. Cela peut également contribuer à l'action de l'extrait aqueux de *A. Pyrethrum* L.

L'extrait méthanolique de *A. pyrethrum* L. avait, presque totalement, supprimé la réponse à la dépolarisation par rapport au contrôle. L'extrait méthanolique de pyrèthre avait une durée de réponse de 5 secondes contre 200 secondes pour le témoin et un pic de l'intensité/surface égale à peu près à 5% par rapport à la ligne de base. On peut déduire que l'extrait au méthanol avait considérablement empêché la mobilisation du calcium après une dépolarisation qui se traduit par une entrée libre des ions Na^+ depuis l'espace extracellulaire parallèlement à une sortie libre des ions K^+ de l'espace intracellulaire et qui devait entraîner systématiquement une entrée rapide et importante du calcium par le biais des VGCC, de manière dépendante de la concentration du calcium extracellulaire ou par son efflux depuis les stocks intracellulaires d'après Lee *et al.* (2013). L'afflux de Ca^{2+} dans les dendrites et le corps cellulaire selon Gleichmann et Mattson (2011), dépend largement du potentiel membranaire, principalement contrôlé par les canaux Na^+ et K^+ . La suppression contrastée de la réponse à la dépolarisation indique une dérégulation du calcium qui peut sous-tendre l'absence apparente d'effets neuroprotecteurs. D'après Zundorf et Reiser (2011), la dérégulation du Ca^{2+} peut être décisive pour la mort des cellules cérébrales. Les interactions entre les ions Ca^{2+} et les ROS, coordonnant la signalisation, peuvent être à la fois bénéfiques ou néfastes. Dans les maladies neurodégénératives, les systèmes de régulation du calcium cellulaire sont compromis dans les deux directions. Les extraits de *A. pyrethrum* L. ont des effets antioxydants clairs. Un stress Oxydatif, un métabolisme énergétique perturbé et des altérations des protéines liées à la maladie, induisent tous, un dysfonctionnement, une perte de la plasticité synaptique et la perte des neurones, toutes dépendantes du Ca^{2+} selon Zundorf et Reiser (2011). Les effets contrastés des extraits sur les réponses fonctionnelles peuvent expliquer les propriétés neuroprotectrices et l'absence apparente de toxicité chez l'extrait aqueux. Cependant, d'autres explications peuvent également justifier ces différences entre les extraits, par le biais d'autres voies intracellulaires en rapport avec le stress oxydant (H_2O_2), la fonction du réticulum endoplasmique et mitochondriale. Ce profil pharmacologique encourageant, mérite des recherches plus poussées, afin de pouvoir identifier les constituants de l'extrait aqueux de *A. Pyrethrum* L. responsables de cette activité neuroprotectrice.

En comparant avec le témoin (fig. 70), les extraits aqueux et méthanoliques de *A. absinthium* L. (0.1mg/ml) ne semblaient avoir aucun effet sur la réponse calcique (fig. 68 et 69). Par ailleurs, les extraits aqueux et méthanolique de *A. absinthium* L. (0.1mg/ml) comme l'extrait méthanolique de pyrèthre, avaient totalement supprimé la réponse à la dépolarisation induite par le KCl par rapport au témoin (fig. 71 et 72). Ces résultats concordaient avec ceux de Kanada *et al.* (2005), ayant travaillé sur des Neurones Granules Cérébelleux de rats. 3,10

et 30 µg/ml d'extrait de feuilles du *Ginkgo biloba*, diminue l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ induite par le kainate. L'inhibition complète par l'extrait avait été observée, dans certains neurones, lorsque la concentration variée entre 10 et 30 µg/ml. L'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ induite par le kainate est due principalement à l'afflux de cet ion par les canaux calcium dépendant du voltage ouvert par la dépolarisation membranaire via l'activation des récepteurs au kainate. Ces auteurs concluaient que cet extrait empêchait le kainate de se fixer sur ses récepteurs spécifiques entravant de cette manière le faufileage des ions Ca^{2+} à travers les canaux calciques situés sur la membrane plasmique. Selon Oyama *et al.* (1996), il existe deux étapes pour augmenter $[Ca^{2+}]_i$; l'activation du récepteur du AMPA/kainate conduisant à la dépolarisation de la membrane puis l'activation, par la dépolarisation, du canal Ca^{2+} dépendant du potentiel.

L'extrait aqueux de *U. urens* L. (0,1 mg/ml) avait généré une réponse fonctionnelle modeste avec une légère diminution du calcium intracellulaire après 8 secondes d'injection (fig.73). Par ailleurs, ce même extrait avait fortement réduit la réponse à la dépolarisation induite par le KCl en environ 7 secondes (fig. 76) par rapport au témoin (fig. 75). De plus, un temps de réponse égal à 200 secondes pour le contrôle contre seulement 18 secondes pour l'extrait aqueux de *U. urens* L. a été observé. On peut dire que l'extrait aqueux de *U. urens* L., même s'il ne possédait pas des propriétés neuroprotectrice contre le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), pouvait empêcher des entrées excessives des ions calcium dans les cellules neuronales. D'ailleurs, plusieurs chercheurs avaient suggéré que les extraits végétaux pouvaient réduire et aller jusqu'à complètement inhiber la réponse calcique suite à une dépolarisation. Lee *et al.* (2013), avaient constaté qu'une augmentation reproductible de $[Ca^{2+}]_i$ pouvait être obtenue en appliquant du KCl (50 mM), aux neurones de l'hippocampe de rat. Le prétraitement des neurones à l'extrait de gland avait inhibé la réponse calcique induite ultérieurement par le KCl. Après lavage de l'extrait de gland, les réponses induites par KCl ont été partiellement récupérées. Ces auteurs suggéraient que l'extrait végétal bloquait la dépolarisation qui induisait l'afflux de Ca^{2+} , par les canaux calciques dépendants du voltage. Les effets inhibiteurs de l'extrait de gland sur l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$, induite par le KCl, traduisaient indirectement qu'il pouvait inhiber la libération de neurotransmetteurs neurotoxiques (ex. glutamate) dans les terminaisons pré synaptiques par inhibition des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants car ces derniers promouvaient la libération de neurotransmetteurs excitateurs à partir des terminaisons axonales des neurones de l'hippocampe (Luebke *et al.*,1993).

En comparaison avec le témoin, l'extrait méthanolique de *U. urens* L. (0,1 mg/ml) n'avait eu aucun effet sur les taux de calcium intracellulaire (fig. 74) mais avait un effet biphasique sur le contenu en calcium suite à la dépolarisation avec le KCL après environ 22 secondes pour le

premier effet et 46 secondes pour le deuxième (fig.77). Les extraits de *U. urens* L. contiennent aussi des polyphénols notamment l'extrait méthanolique qui contenait une plus grande proportion en ces molécules par rapport à l'extrait aqueux. Parmi ces molécules, on trouve les acides phénoliques tels que l'acide phénolcarboxilique, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide ellagique et les flavonoïdes telles que la patulétine, la rutine, le kaempférol, la quercétine, l'isorhamnetine (Nencu *et al.*, 2015 ; El-Seadawy *et al.*, 2018).

Le neurotransmetteur glutamate active les récepteurs non-N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Dingledine *et al.*, 1999). Une excitotoxicité par un excès de cette molécule (Olney et de-Gubareff, 1978) et une activation excessive des récepteurs du glutamate, entraînant l'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium $[Ca^{2+}]_i$ et la génération d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), impliquée dans la dégénérescence et la mort neuronale (Choi,1992). En fait, au niveau de la fonte synaptique, le glutamate, en activant les récepteurs ionotropiques (NMDA), ouvre les canaux membranaires perméables principalement au Na^+ , conduisant à une dépolarisation de la membrane des corps cellulaires des neurones. Cette dépolarisation active les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants qui permettent l'afflux de calcium à l'intérieur des neurones (Lee *et al.*, 2013). La concentration de Ca^{2+} cytosolique $[Ca^{2+}]_i$ peut également être élevée par la libération de Ca^{2+} à partir de réserves intracellulaires sensibles à l' IP_3 par l'activation de la phospholipase C (PLC), induite par les récepteur métabotropiques du glutamate (Zundorf et Reiser, 2011 ; Lee *et al.*, 2013).

Il a été démontré que les antagonistes des récepteurs du glutamate NMDA possèdent une action neuroprotectrice (Rogawski *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2013). Lee *et al.* (2013), avaient montré que 1 mg/ml d'extrait de gland, inhibaient complètement l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ induite par 100 μ M de glutamate, dans les neurones cultivés de l'hippocampe de rat et que, après épuisement des réserves intracellulaires de Ca^{2+} en injectant aux cellules 1 μ M de thapsigargine, un inhibiteur de Ca^{2+} -ATPase du réticulum endoplasmique, le traitement des neurones avec seulement 50 μ g/ml min d'extrait de gland avait diminué les augmentations ultérieures de $[Ca^{2+}]_i$ induites par le glutamate. Ces auteurs suggéraient la possibilité que l'extrait de gland inhibe la réponse calcique induite par le glutamate par une liaison directe à de multiples récepteurs ionotropiques du glutamate, tels que les récepteurs AMPA et NMDA et à des canaux Ca^{2+} dépendants du voltage. Cependant, au niveau moléculaire, aucune information sur la façon dont cet extrait végétal pouvait exercer ses effets inhibiteurs sur les canaux n'avait été mentionnée.

Les composés phénoliques, selon plusieurs auteurs, affecteraient les fonctions de divers canaux ioniques tels que les canaux K^+ (Choi *et al.*, 2001) et les canaux Na^+ (Wallace *et al.*, 2006). La génistéine, par exemple, bloque les canaux Na^+ voltage-dépendants par une liaison directe avec ces derniers (Paillar *et al.*, 1997). L'epigallocatechine-3-gallate inhibe les canaux rKv1.5 (Choi *et al.*, 2001). L'apigénine inhibe le courant Cl^- activé par le GABA en se liant au site de la benzodiazépine (Avallone *et al.*, 2000). En plus, les polyphénols interagissent avec la bicouche lipidique de la membrane cytoplasmique pour exercer leurs fonctions biologiques (Hendrich, 2006). Les lipides membranaires peuvent affecter la structure et le fonctionnement des canaux ioniques (Tillman et Cascio, 2003). Par conséquent, Lee *et al.* (2013) ne pouvaient pas exclure une troisième possibilité ; que l'extrait de gland inhibait la signalisation calcique induite par le glutamate en interagissant avec la bicouche lipidique de la membrane et en inhibant indirectement les multiples canaux ioniques.

Les canaux Ca^{2+} sont, aussi, des cibles des polyphénols selon plusieurs auteurs. Les composés phénoliques ont la capacité de réduire l'augmentation du calcium induite par le glutamate dans les neurones en culture d'hippocampe de rat (Ahn *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2011). Des composés phénoliques tels le gallate d'ocytyle et les flavonoïdes affectent les flux de Ca^{2+} dans les cellules hypophysaires GH4C1 du rat (Summanen *et al.*, 2001). En outre, le gallate d'ocytyle pouvait inhiber la signalisation de Ca^{2+} dans les cellules PC12 à travers de multiples voies, y compris les canaux Ca^{2+} voltage dépendants et les canaux ioniques perméables au Ca^{2+} (Guo *et al.*, 2010). Les polyphénols sont censés atténuer la neurotoxicité et l'ischémie cérébrale induite par les bêta-amyloïdes (Ono *et al.*, 2003). L'acide gallique, l'un des principaux antioxydants de l'extrait de radix Sanguisorbae, empêcherait la mort neuronale apoptotique, induite par les bêta-amyloïdes, en interférant avec l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ dans les neurones corticaux de rat (Ban *et al.*, 2008).

L'extrait aqueux de *A. pyrethrum* L. contient des métabolites secondaires et leurs dérivés comme les acides chlorogéniques. Ces acides présentent une fonction antioxydante (Bhattacharjee et Datta, 2015) et protègent les neurones des effets toxiques du glutamate (Mikami et Yamazawa, 2015). Les acides chlorogéniques ont des capacités antimicrobiennes, antibactériennes, antivirales et anti-inflammatoires, qui peuvent contribuer à la prévention des maladies chroniques et cardiovasculaires, telles que décrites par plusieurs études *in vivo* et *in vitro* (Peng *et al.*, 2015 ; Butiuk *et al.*, 2016). Les acides caféoylquiniques, contenus dans cet extrait, sont communs à de nombreuses espèces végétales qui comprennent de nombreuses plantes comestibles telles que le caféier. Des avantages potentiels pour la santé ont été associés à la consommation de café, notamment une incidence réduite de plusieurs maladies chroniques

et dégénératives telles que le cancer, les troubles cardiovasculaires, le diabète et la maladie de Parkinson (Nkondjock, 2009 ; Ludwig *et al.*, 2014). La consommation de café a été suggérée pour réduire le risque de développer la maladie d'Alzheimer (Perry et Howes, 2011).

La pellitorine avait été signalé comme produits propre à l'espèce *Anacyclus* (Kumar et Choudhary, 2016 ; CCD, 2018). C'est le composé le plus abondant dans les racines de pyrèthre (Kumar et choudhary, 2016). Cet alkamide pouvait agir positivement sur l'afflux de calcium. La pellitorine, selon Olah *et al.* (2016), avait bloqué la sur pénétration excessive du Ca^{2+} évoquée par la capsaïcine avec une IC_{50} de 154 $\mu\text{g/ml}$ dans les lignées cellulaires HaCaT. La pharmacocinétique de perméabilité du BBB pour cet N-alkylamide ont été évaluées chez le rat. Une injection intraveineuse de pellitorine avait montré une pénétration rapide et élevée de la BBB, permettant à 97% de la pellitorine d'atteindre le cerveau et seulement 3% restaient dans les capillaires cérébraux (Veryser *et al.*, 2016).

5.7. Caractérisation biochimique de l'extrait aqueux de *Anacyclus pyrethrum*

Anacyclus pyrethrum L., un membre de la famille des Asteraceae, est une espèce méditerranéenne occidentale avec une répartition restreinte au Maroc, en Algérie et dans le sud de l'Espagne. La tendance de la population de *A. pyrethrum* L. est en baisse ; en effet, le nombre d'individus matures et la densité de population ont été considérablement réduits au cours des dernières décennies et l'espèce se rencontre souvent dans de petites sous-populations fragmentées en raison de nombreuses menaces. La surexploitation de cette plante médicinale dans la nature a contribué à son déclin, en particulier lorsque la partie qui a un intérêt médical est la racine. L'exploitation continue de cette plante en tant que stimulant naturel et pour ses propriétés insecticides a entraîné un déclin de la population le classant parmi les espèces vulnérables selon la dernière liste rouge de l'UICN (UICN, 2017). Les stratégies de protection des populations de *A. pyrethrum* L. au Maroc ont inclus des essais de plantation, le suivi et la promotion de pratiques d'exploitation durables et la protection des zones de culture contre le braconnage (Ouarghidi *et al.*, 2017).

L'analyse haute résolution LC-UV-MS / MS a révélé la détection de différentes classes de composés dans les extraits aqueux et méthanoliques de *A. Pyréthrum* L. Les composés détectés ont été attribués à partir de leurs ions $[M + H]^+$ (ou $[M + NH_4]^+$) observés, de leur masse d'accumulation (ppm) et du spectre de support UV disponible (tableau 5). Les composés détectés comprenaient les acides aminés, les acides caféoylquiniques, la N-feruloyltyramine et les alcaloïdes.

Tableau 5. Composés attribués issus de l'analyse LC-UV-MS/MS des extraits de racines de *A. pyrethrum* L.

	Assigned compound# (or isomer)	Retention time (min)	Molecular formula	(m/z)	Ion	<i>A. pyrethrum</i> L. root water extract ppm#	<i>A. pyrethrum</i> L. root methanol extract ppm#
1	Alkaloid	1.8	C7H13NO2	144.1022	[M + H] ⁺	2.670	1.629
2	Leucine/isoleucine	1.9	C6H13NO2	132.1022	[M + H] ⁺	2.383	2.004
	Leucine/isoleucine	2.5	C6H13NO2	132.1020	[M + H] ⁺	1.247	1.702
3	Phenylalanine	3.1	C9H11NO2	166.0864	[M + H] ⁺	1.053	1.956
4	Caffeoylquinic acid	4.5	C16H18O9	355.1031	[M + H] ⁺	2.736	2.820
5	Tryptophan	4.6	C11H12N2O 2	205.0977	[M + H] ⁺	2.466	3.344
	Caffeoylquinic acid	5.9	C16H18O9	355.1025	[M + H] ⁺	2.651	1.806
6	Hydroxy- dimethoxycoumarin	6.4	C11H10O5	223.0607	[M + H] ⁺	2.579	1.928
7	Dicaffeoylglucaric acid	6.8	C24H22O14	535.1096	[M + H] ⁺	2.482	1.903
8	Roseoside	7.4	C19H30O8	387.2024	[M + H] ⁺	2.623	2.468
9	Alkaloid	8.9	C26H36N2O 7	489.2601	[M + H] ⁺	1.108	0.045
	Alkaloid	9.3	C26H36N2O 7	489.2599	[M + H] ⁺	0.740	1.987
10	Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	9.9	C25H24O12	517.1354	[M + H] ⁺	2.915	2.567
	Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	10.8	C25H24O12	517.1351	[M + H] ⁺	Nd	2.083
11	Propenyl-benzenetriol; di-Me ether, pentosyl- hexoside	11.9	C22H32O12	506.2246	[M + NH4] ⁺	2.841	2.169
12	<i>N</i> -Feruloyltyramine	12.0	C18H19NO4	314.1395	[M + H] ⁺	2.691	0.940
13	6-Hydroxypellitorine*	16.5	C14H25NO2	240.1962	[M + H] ⁺	1.434	2.516
14	2,8-Decadiene-4,6- diynoic acid; 2- methylpropylamide, <i>N</i> - Me* (or) 2,4- Undecadiene-8,10- diynoic acid; 2- methylpropylamide*	16.6	C15H19NO	230.1543	[M + H] ⁺	2.430	1.343
15	Alkaloid	17.1	C18H27NO3	306.2071	[M + H] ⁺	2.449	2.547
	Alkaloid	17.2	C18H27NO3	306.2073	[M + H] ⁺	3.069	2.155
16	<i>N</i> -(2-Phenylethyl)-2,4- undecadiene-8,10- diynamide*	17.5	C19H19NO	278.1541	[M + H] ⁺	3.808	0.608
17	Alkaloid	17.6	C17H21NO3	288.1600	[M + H] ⁺	2.117	0.625
18	Alkaloid	17.8	C17H19NO3	286.1442	[M + H] ⁺	0.437	0.105
19	2,4-Decadienoic acid isobutyla-mide*	19.6	C14H25NO	224.2011	[M + H] ⁺	0.743	0.807
20	Methylpellitorine	20.3	C15H27NO	238.2168	[M + H] ⁺	2.472	0.961
21	Dodecadienoic acid isobutyla-mide*	20.8	C16H29NO	252.2328	[M + H] ⁺	4.198	2.533
	Dodecadienoic acid isobutyla-mide*	21.3	C16H29NO	252.2324	[M + H] ⁺	3.643	0.868
22	<i>N</i> -(4- Hydroxyphenethyl)-2,4- tetradecadienamide*	21.7	C22H33NO2	344.2589	[M + H] ⁺	2.714	1.377

23	2,4-Tetradecadienoic acid iso-butylamide*	22.5	C18H33NO	280.2640	[M + H] ⁺	3.243	1.744
24	N-Isobutyl-hexadecadienamide (or) 2-Hexadecenoic acid pyrrolidide	23.6	C20H37NO	308.2955	[M + H] ⁺	1.520	2.396
25	Octadecadienoic acid; pyrrolidide	23.9	C22H39NO	334.3106	[M + H] ⁺	2.957	0.594
	Octadecatrienoic acid; piperidide	24.6	C23H39NO	346.3105	[M + H] ⁺	2.569	0.227
26	2-Octadecenoic acid; piperidide	26.5	C23H43NO	350.3419	[M + H] ⁺	5.133	0.424
27	Eicosadienoic acid; piperidide	26.7	C25H45NO	376.3579	[M + H] ⁺	2.679	1.298
	Eicosadienoic acid; piperidide	27.6	C25H45NO	376.3581	[M + H] ⁺	Nd	1.776

Tous les composés sont attribués par comparaison de données de masse précises (sur la base du nombre de ppm) et par interprétation des spectres MS / MS et / ou UV disponibles.

Nd : Non détecté / inférieur au niveau de détection. * Signalé comme produits propre à l'espèce *Anacyclus* (CCD, 2018).

Vingt sept composés différents ont été identifiés dans l'extrait aqueux de *A. pyrethrum* L., représentant 95,25% de l'ensemble de l'extrait ; la dominance revient aux alcaloïdes avec 53,59% dont 22,52 % sont des alkylamides qui ont déjà été rapportés dans les racines de *A. pyrethrum* L. (Amrita *et al.*, 2011 ; Boonen *et al.*, 2011 ; Elazzouzi *et al.*, 2014 ; Althaus *et al.*, 2017). Des résultats similaires avaient été obtenus par Selles *et al.* (2012) dans les racines, les feuilles et les fleurs du pyrèthre d'Algérie. Treize alkamides étaient identifiés dans l'extrait éthanolique de racines de pyrèthre par HPLC-UV/ESI-MS, parmi eux cinq N-isobutylamides (Undeca-2E,4E-diene-8,10-dienoic acid IBA, Deca-2E,4E-dienoic acid IBA (pellitorine), Tetradeca-2E,4E-diene-8,10-dienoic acid IBA (anacycline), Tetradeca-2E,4E, XE/Z, YE/Z-tetraenoic IBA et le Dodeca-2E,4E-dienoic acid IBA), trois N-methylisobutylamides (Undeca-2E, 4E-diene-8,10-dienoic acid N-Me IBA, Deca-2E, 4E-dienoic acid N-Me IBA, Tetradeca-2E, 4E-diene-8, 10-dienoic acid N-Me IBA), quatre tyramides ou 4- hydroxyphenylethylamides (Deca-2E,4E-dienoic acid 4-OH PEA, Tetradeca-2E,4E-diene-8,10-dienoic acid 4-OH PEA, Dodeca-2E,4E-dienoic acid 4-OH PEA, Tetradeca-2E,4E, XE/Z-trienoic acid 4-OH PEA)et un 2-phenylethylamides (Undeca-2E,4E-diene-8,10-dienoic acid 2-PEA) (Boonen *et al.*, 2011 ; Sharma *et al.*, 2013 ; Kumar *et choudhary*, 2016).

D'après Boonen *et al.* (2012), en fonction de la méthode d'extraction et du solvant utilisé, différents rendements en constituants de N-alkylamide peuvent être atteints, causant éventuellement des variations des effets biologiques et de la toxicité. Les plantes connues comportées des alkylamides sont les espèces *Anacyclus pyrethrum*, *Spilanthes acmella*, *Achillea millefolium* et *Echinacea*, toutes appartenant à la famille des Asteraceae (Wynendaele

et al., 2018). Parmi ces alkylamides trouvés dans les extraits de racines de *A. pyrethrum* L., un composé majeur qui est le deca-2E,4E-dienoic acid isobutylamide, appelé aussi pellitorine ou pyréthrine (Zaidi *et al.* 2013 ; Usmani *et al.* 2016 : Althaus *et al.* 2017 et Cherrat *et al.*, 2017). Cette molécule se trouve à peu près avec les mêmes proportions dans les deux extraits de cette espèce. C'est un mélange d'isobutylamides d'acides insaturés en C10, C12 et C14 avec le décadiène isobutylamide comme constituant principal (Kumar et Choudhary, 2016 ; Tauheed *et al.*, 2017). Les pyréthrines obtenues à partir des racines de la plante constituent un groupe naturel de six esters chimiquement apparentés. La pyréthrine I, la cinérine I et la Jasmoline I sont des esters de l'acide chrysanthémique. La pyréthrine II, la cinérine II et la jasmoline II sont des esters de l'acide pyréthrique (Kushwaha *et al.*, 2012). La pellitorine a été signalé comme produits propre à l'espèce de *Anacyclus* (Kumar et Choudhary, 2016 ; CCD, 2018). C'est le composé le plus abondant dans les racines de pyrethre (Kumar et choudhary, 2016). Cet alkamide peut agir positivement sur l'afflux de calcium. Selon Olah *et al.* (2016), la pellitorine peut bloquer la sur-pénétration du Ca²⁺ évoquée par la capsaïcine avec une IC₅₀ de 154 µg/ml chez les lignées cellulaires HaCaT. Les propriétés pharmacocinétiques de perméabilité du BBB pour ce N-alkylamide ont été évaluées chez le rat. Une injection intraveineuse de pellitorine avait montré une pénétration rapide et élevée de la BBB, permettant à 97% de la pellitorine d'atteindre le cerveau et seulement 3% restaient dans les capillaires cérébraux (Veryser *et al.*, 2016).

Les pyréthrines sont enregistrées comme insecticides aux états unis par l'agence de protection de l'environnement (EPA, 2018). Cet insecticide est sans danger parce qu'il est inoffensif pour l'être humain (Burgess *et al.*, 1994). Selon Boonen *et al.* (2011), les N-alkylamides sont à l'origine du caractère aphrodisiaque du pyrèthre. Akarkarha est un agent aphrodisiaque étonnant parce qu'il contient de la pellitorine, un alkylamide qui peut être responsable de l'amélioration des fonctions sexuelles. La pellitorine imite ou augmente la sécrétion de testostérone car tous les effets androgéniques ont été observés dans des modèles expérimentaux ayant validé son effet viagra (Kumar et Choudhary, 2016). Des extraits aqueux de racines de *A. pyrethrum* L. augmentaient les taux sériques de testostérone et de gonadotrophines (LH, FSH) en raison de la présence de pellitorine qui avait un impact positif sur la reproduction chez les rats (Shahraki *et al.*, 2014). La 6-Hydroxypellitorine qui fait partie intégrale des composantes de cette drogue (CCD, 2018), a été similairement observée dans nos deux extraits mais plus abondante dans l'extrait alcoolique (2.516 ppm) que dans l'extrait aqueux (1.434 ppm). Par ailleurs, la Methylpellitorine a été trouvée en quantité plus importante

dans l'extrait aqueux (2.472 ppm) par rapport à l'extrait méthanolique (0.961 ppm) des racines de pyrèthre.

A la fin des années 60, **Burden et Crombie** avaient montré que *A. pyrethrum* L. contenait le N-[2-(p-hydroxyphényl)-éthyl] déca-, dodéca et tétradéca-trans-2, trans-4-diènamide, une nouvelle série d'amides correspondant à la tyramine isobutylamide, la lignane (y compris la sésamine) (**Selles, 2012**). D'après **Gautam et al. (2011)**, **Kushwaha et al. (2012)**, **Kalam et al. (2015)**, **Usmani et al. (2016)** et **Althaus et al. (2017)**, les racines de pyrèthre contiennent du N- (2-P-hydroxyphényléthyl) déca-, dodéca et tétradéca-trans-2, qui est une nouvelle série de tyramine, amides correspondant aux isobutylamides classé aussi par le CCD comme l'un des composés des racines de pyrèthre (**CCD, 2018**). Cette même molécule avait été détectée dans les extraits aqueux et méthanolique de *A. pyrethrum* L. d'Algérie avec une plus grande concentration de 2.714 ppm dans l'extrait aqueux contre 1.377 ppm dans l'extrait méthanolique.

Les racines de cette plante contiennent du tetradeca-2E,4E-dien-8,10-diynoic acid isobutylamide (anacycline) (3.243ppm dans l'extrait aqueux contre 1.744 ppm dans l'extrait méthanolique). Cette molécule était reconnue par la CCD comme étant l'un des constituants officiels du pyrèthre (**CCD, 2018**), qui été utilisé traditionnellement comme tonique pour le système nerveux (**Annalakshmi et al., 2012 ; Sujith et al., 2012**). Ces résultats concordaient avec ceux d'**Althaus et al. (2017)**.

Le Dodecadienoic acid isobutylamide, reconnu également par la CCD, caractérisaient aussi dans nos extraits surtout l'extrait aqueux (4.198 et 3.643 ppm). Le dodeca-2E,4E-dienoic acid isobutylamide, appelé alkylamide 15 (A15) selon un système de numérotation décrit par **Cech et al. (2006)**. L'alkylamide A15 de *E. purpurea* inhibait l'afflux de calcium dans les mastocytes de souris (C57BL/6) (**Gulledge et al., 2018**), protégeant ainsi ces cellules de l'inflammation dû à une entrée trop importante de cet ion.

Le 2,8-Decadiene-4,6-diynoic acid; 2-methylpropylamide, *N*-Me ou le 2,4-Undecadiene-8,10-diynoic acid; 2-methylpropylamide sont des alcaloïdes propres à cette espèce (**CCD, 2018**), également présents dans l'extrait aqueux (2.430 ppm) et méthanolique (1.343 ppm) de racines de *A. pyrethrum* L.

Le *N*-(2-Phenylethyl)-2,4-undecadiene-8,10-diynamide, molécule propre à cette espèce aussi (**Althaus et al., 2017 ; CCD, 2018**) et très présente dans l'extrait aqueux avec la valeur de 3.808 ppm, alors que dans l'extrait méthanolique elle ne dépassait pas les 0.608ppm. Les pipéridines, un groupe d'alcaloïdes important dans *A. pyrethrum* L., qui se sont révélés présenter diverses bio-activités (**Chen et al., 2018**). Parmi les pipéridines détectées dans

l'extrait aqueux et alcoolique du pyrèthre d'Algérie on peut citer l'octadecatrienoic acid ; piperidide, le 2-octadecenoic acid ; piperidide et eicosadienoic acid; piperidide, très abondants dans l'extrait aqueux.

Les alkylamides peuvent susciter des effets souhaitables au système nerveux central (**Veryser et al., 2014**). Les alcaloïdes jouent un rôle très important dans la neuroprotection. A titre d'exemple, les alcaloïdes de *Piper longum* L. (Piperaceae) protègent les cellules dopaminergiques de la neurotoxicité induite par le 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) en améliorant les anomalies comportementales, en augmentant les niveaux de la dopamine et de ses métabolites associés. Ils renforcent aussi la défense antioxydante en augmentant les niveaux de GSH et de SOD tout en abaissant les niveaux du MDA (**Bi et al., 2015**). Plusieurs maladies du système nerveux central telles que l'épilepsie ou les troubles neuro-dégénératifs par exemple, sont encore difficiles à traiter et l'un des obstacles est la barrière hémato-encéphalique imperméable, empêchant les médicaments de franchir cette barrière. **Woelkart et al. (2009)** ont démontré que les dodeca2E, 4E, 8Z, 10E/Z-tetraenoic acid isobutylamides (tétraènes provenant de l'échinacée), administrés par voie orale à des rats étaient biodisponibles avec un passage rapide à travers la barrière hémato-encéphalique. Ces résultats suggèrent une action possible des N alkylamides dans le système nerveux central.

Ces molécules avaient été également utilisées pour traiter la neuro-dégénérescence. Un exemple intéressant c'est la galanthamine (**Masondo et al., 2019**), un alcaloïde isolé des bulbes de la famille des Amaryllidacées, utilisée pour le traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer (**Scott et Goa, 2000 ; Sharma et al., 2019**). C'est un inhibiteur compétitif réversible de l'acétylcholinestérase et il interagit également de manière allostérique avec les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine pour potentialiser son action. En agissant pour améliorer la fonction cholinergique centrale, associée aux premiers stades de cette maladie, des améliorations significatives des symptômes cognitifs et comportementaux ont été observées (**Scott et Goa, 2000 ; Sharma et al., 2019**). Selon **Shrivastava et al. (2019)**, la galanthamine pourrait être utilisé pour la conception et le développement de nouveaux inhibiteurs d'acétylcholinestérases.

De nombreuses études visaient à élucider les effets neuroprotecteurs de la galantamine (**Egea et al., 2012**). Elle inhibe l'agrégation de la β Amyloïde et la cytotoxicité (**Melo et al., 2009**). Elle peut piéger les espèces réactives de l'oxygène, ce qui protège les neurones contre les dommages oxydatifs (**Tsvetkova et al., 2013**). La galantamine favorise également la neurogenèse chez l'adulte dans l'hippocampe de souris via les récepteurs muscariniques M1 et nicotiques $\alpha 7$ de l'acétylcholine (**Kita et al., 2014**).

Certains alcaloïdes d'origines végétales tels que Berberine et la caféine ont un rôle anti inflammatoire et donc anti neuro-dégénératif, d'autres sont anti-apoptotique comme la Huperzine A (Ng *et al.*, 2015). Une inhibition *in vitro* de la cyclooxygénase et de la 5-lipoxygénase par des alkylamides isolés à partir de *A. pyrethrum* L. a également été rapportée (Müller-Jakic *et al.*, 1994), d'où leur effet anti-inflammatoire.

L'isolement et la caractérisation de ces alcaloïdes par spectroscopie RMN seront nécessaires pour déterminer leurs structures chimiques et leurs activités biologiques. Leur détection dans cet extrait indique donc qu'il serait utile d'étudier ces classes de composés pour comprendre les utilisations traditionnelles potentielles de ces substances. Pour déterminer les autres activités des alkylamides provenant de cette espèce ça nécessiterait un isolement et une élucidation de leur structure.

L'extrait contient aussi 16,58% de métabolites secondaires et leurs dérivés comme les acides chlorogéniques. Parmi les groupes de composés présents dans les plantes, les acides chlorogéniques sont l'un des plus importants. Ils font partie d'un groupe de composés phénoliques caractérisés comme des esters d'acide hydrocinnamique et d'acide quinique, l'isomère le plus courant étant l'acide 5-caféoylquinique (Kremr *et al.*, 2015 ; Shin *et al.*, 2015 ; Meinhart *et al.*, 2018). Les principaux hydroxycinnamates sont les acides p-coumarique, caféique, férulique et sinapique (Clifford *et al.*, 2017).

Les acides chlorogéniques ont des capacités antimicrobiennes, antibactériennes, antivirales et anti-inflammatoires qui peuvent contribuer à la prévention des maladies chroniques et cardiovasculaires, telles que décrites par plusieurs études *in vivo* et *in vitro* (Peng *et al.*, 2015 ; Butiuk *et al.*, 2016). Peng *et al.* (2015) ont observé que chez le rat soumis à un régime hyperlipidique, l'administration de 20 mg / kg de poids corporel de 5-caféoylquinique acid, une fois par jour pendant 11 semaines, influençait positivement l'homéostasie du métabolisme du glucose. Ces composés sont également bénéfiques pour le traitement des maladies du foie (Wang *et al.*, 2009 ; Zheng *et al.*, 2015) et du métabolisme des lipides, en plus d'interférer dans l'absorption et la biosynthèse de cholestérol avec réduction des LDL (Arantes *et al.*, 2016 ; Cho *et al.*, 2016). Ils présentent une fonction antioxydante (Bhattacharjee et Datta, 2015) et protègent les neurones des effets toxiques du glutamate (Mikami et Yamazawa, 2015) et les cellules endothéliales du stress oxydatif (Jiang *et al.*, 2016). L'acide caféoylquinique et l'acide Di-O- caféoylquinique sont présents dans les deux extraits avec à peu près les mêmes proportions. L'acide 5-caféoylquinique ainsi que l'acide Di-O- caféoylquinique sont connus pour leurs effets antioxydant et cytoprotecteur (Xican Li *et al.*,

2018). Ce qui justifie peut-être l'activité antioxydante des deux extraits et l'activité neuroprotectrice de l'extrait aqueux du pyrèthre qui s'est avéré riche en ces molécules.

Les acides caféoylquiniques sont communs à de nombreuses espèces végétales qui comprennent de nombreuses plantes comestibles telles que le caféier. Des avantages potentiels pour la santé ont été associés à la consommation de café, notamment une incidence réduite de plusieurs maladies chroniques et dégénératives telles que le cancer, les troubles cardiovasculaires, le diabète et la maladie de Parkinson (**Nkondjock, 2009 ; Ludwig et al., 2014**). La consommation de café a été suggérée pour réduire le risque de développer la maladie d'Alzheimer (**Perry et Howes, 2011**). Les effets protecteurs ont été attribués aux acides quiniques présents dans le breuvage (**Ludwig et al., 2014**). Gonzalez-Sarrias *et al.* (**2016**) avaient évalué le potentiel neuroprotecteur de 19 métabolites dérivés des polyphénols, dont l'acide dihydrocafféique et l'acide 3',4'-dihydroxyphénylacétique. A 5 µmol/L, les deux acides caféoylquiniques atténuent significativement la cytotoxicité induite par l'H₂O₂ dans les cellules de neuroblastome SH-SY5Y. Les effets neuroprotecteurs les plus forts se sont produits à 10 µmol/l. Cette concentration réduit significativement les niveaux de ROS dans les cellules SH-SY5Y et diminue l'apoptose induit par le stress oxydatif en empêchant l'activation de la caspase 3 via la voie apoptotique mitochondriale. Dans une étude similaire, Verzelloni *et al.* (**2011**) avaient étudié la capacité d'un ensemble de catabolites de polyphénols générés *in vivo* à partir de différentes sources alimentaires à contrer la neurotoxicité liée au stress oxydatif dans des neuroblastomes humain SK-N-MC. Les composés ont été testés à des concentrations allant de 0,1 à 20 µmol/l, l'acide dihydrocafféique avait montré des effets protecteurs significatifs à 0,5 µmol/l. L'acide dihydrofêrulique et la feruloylglycine protégeaient également les neurones contre la toxicité induite par le 2,3-diméthoxy-1,4-naphtoquinone avec une survie accrue à un stress oxydatif allant de 6,5 à 17,0%.

Pendant de nombreuses années, des études mécanistiques avaient lié les effets protecteurs des polyphénols alimentaires à leur activité antioxydante (**Clifford et al., 2017**). Cependant, on avait constaté que les polyphénols exerçaient des effets modulateurs sur les cellules par une action sélective sur de multiples voies de signalisation cellulaire impliquées dans la pathogenèse des maladies dégénératives indiquant que les effets sur la santé vont au-delà de la simple activité antioxydante (**Del Rio et al., 2013 ; Rodriguez-Mateos et al., 2014**).

7,31% de l'extrait aqueux est constituée d'acides aminés comme le phénylalanine, leucine, l'isoleucine et le tryptophane. Les roseosides et les propenyl-benzenetriol; di-Méthyl ether, pentosyl-hexosides étaient également présents dans les deux extraits mais plus répandus dans l'extrait aqueux de pyrethre. Selon Bendjeddou *et al.* (**2003**), les extraits polysaccharides

de racines de pyrèthre ont une activité immuno-stimulante. La drogue avait montré une bonne propriété antioxydante contre les radicaux OH \cdot , H $_2$ O $_2$ et une capacité de piégeage du NO $_2$ en fonction de la dose. Il a également inhibé la peroxydation des lipides. Selon Selles *et al.* (2012) et Sujith *et al.* (2011), cette propriété antioxydante est due à la présence d'eugénol, de phénols, de flavonoïdes, d'acides ascorbiques, d'alcaloïdes et de tanins. *A. pyrethrum* L. semble donc être une plante riche en métabolites secondaires. Ce fait pourrait justifier leur extraction et leur utilisation notamment dans la prévention et la prise en charge de nombreuses maladies (Elazzouzi *et al.*, 2014).

A travers ce travail, nous avons tenté de contribuer à la valorisation de *A. pyrethrum* L. Algérien en établissant une caractérisation chimique et biologique de la plante. La composition chimique des extraits de *A. pyrethrum* L., récoltés dans la région de Tiaret en période de floraison, nous a permis d'identifier deux chémotypes intermédiaires.

A decorative graphic consisting of a thin vertical line on the left side, a thin horizontal line at the top, and a wider vertical gray bar on the left side, all intersecting at the top-left corner.

Conclusion

Conclusion générale

La capacité fonctionnelle du cerveau humain se détériore avec le temps, accentuée par des facteurs endogènes et exogènes. Le stress oxydatif est un des facteurs induisant l'oxydation des lipides, des protéines et des acides nucléiques, et la modulation des voies de signalisation apoptotiques contribuant à la perte de la fonction cérébrale. L'homéostasie du Ca^{2+} subit, elle aussi, une dys-régulation subtile au cours du vieillissement physiologique. Les produits du métabolisme énergétique qui s'accumulent avec l'âge et le stress oxydatif altèrent progressivement l'homéostasie du calcium, rendant les neurones plus vulnérables au stress supplémentaire, ce qui peut conduire à une dégénérescence neuronale.

L'identification des composants neuroprotecteurs est une stratégie pour faciliter le vieillissement cérébral sain et contrer certaines maladies neurodégénératives. Des antioxydants synthétiques antérieurs tels que le butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA) ont été utilisés pour atténuer les pathologies liées au stress oxydatif, mais les inquiétudes sérieuses émergeant de leur utilisation étendue comme la toxicité et la cancérogénicité ont nécessité la recherche de meilleures alternatives.

À ce jour, les produits naturels provenant de plantes médicinales font l'objet de nombreuses recherches pour des applications biomédicales, la récupération de bioactifs et le développement de médicaments pharmacologiques. Les plantes médicinales ont été reconnues pour leur énorme potentiel thérapeutique en raison de l'abondance de composés phytochimiques comme les phénols et les flavonoïdes qui présentent une myriade de propriétés biologiques. Ce retour à la médecine traditionnelle est la cause de diverses raisons, à savoir, le coût qui est faible comparé aux médicaments conventionnels, la disponibilité des plantes et notamment l'existence de maladies pour lesquelles il n'y a pas de traitement pharmaceutique efficace (Touami, 2017).

L'objectif primordial de cette étude vise à évaluer les propriétés antioxydantes et neuroprotectrices de certaines plantes médicinales Algériennes. Le choix de ces plantes est basé sur des données ethno-pharmacologiques.

Les résultats obtenus ont révélé que la quantité des composés phénoliques totaux sont un peu plus élevée ($33,83 \pm 2,02 \mu\text{g d'AGE/mg d'extrait}$) dans l'extrait méthanolique que dans l'extrait aqueux ($24,83 \pm 1,60 \mu\text{g d'AGE/mg d'extrait}$) des racines de *A. pyrethrum* L. ($p < 0.05$). La quantité des flavonoïdes semble être très hautement significatives dans l'extrait aqueux ($1,40 \pm 0,02 \mu\text{g QE/mg d'extrait}$) par rapport à l'extrait méthanolique des racines de *A. pyrethrum* L. ($0,84 \pm 0,00 \mu\text{g QE/mg d'extrait}$) ($p < 0.001$). Les quantités des polyphénols des extraits de

feuilles de *A. absinthium* L. ne semblent pas présenter des différences significatives ($p > 0.05$) entre l'extrait aqueux ($12,33 \pm 5,85 \mu\text{g AGE/mg d'extrait}$) ou bien méthanolique ($16 \pm 6,55 \mu\text{g AGE/mg d'extrait}$). Par ailleurs, les flavonoïdes dans l'extrait méthanolique de *A. absinthium* L. ont été plus abondants ($1,07 \pm 0,018 \mu\text{g QE/mg d'extrait}$) en comparaison avec l'extrait aqueux ($0,49 \pm 0,088 \mu\text{g QE/mg d'extrait}$) ($p < 0.001$). Selon l'analyse phytochimique, la teneur totale en composés phénoliques exprimée en équivalents d'acide gallique pour les extraits d'*U. urens* révèle que l'extrait aqueux des feuilles de *Urtica urens* L. semble contenir une quantité de polyphénols qui avoisine les $20,66 \pm 3,78 \mu\text{g AGE/mg d'extrait}$, alors que celle présente dans l'extrait méthanolique est de $36,66 \pm 5,25 \mu\text{g AGE/mg d'extrait}$ ($p < 0.05$). Par ailleurs, les flavonoïdes ont été assez abondantes dans l'extrait méthanolique de *Urtica urens* L. avec des concentrations qui avoisinent les $28,91 \pm 2,34 \mu\text{g QE/mg d'extrait}$ alors que dans l'extrait aqueux cette concentration ne dépassait pas les $5,61 \pm 0,20 \mu\text{g QE/mg d'extrait}$ ($p < 0.001$).

A. pyrethrum L. peut être considéré comme un puissant antioxydant avec un $\text{IC}_{50} = 0.043 \pm 0,00 \text{mg/ml}$, cependant l'activité anti-radicalaire la plus faible a été avec l'extrait aqueux ($\text{IC}_{50} = 0,320 \pm 0,11 \text{mg/ml}$). *A. absinthium* L. montre un IC_{50} de $0.193 \pm 0,00 \text{mg/ml}$ pour l'extrait aqueux et de $0.107 \pm 0,00 \text{mg/ml}$ pour l'extrait méthanolique alors que *U. urens* L. présente les valeurs d' IC_{50} de $0.198 \pm 0,02 \text{mg/ml}$ d'extrait aqueux et $0.146 \pm 0,00 \text{mg/ml}$ d'extrait méthanolique.

La deuxième méthode d'évaluation de l'activité antioxydante des six extraits végétaux est celle du pouvoir réducteur. Les six extraits ont un pouvoir réducteur proportionnel à leurs concentrations. Le pyrèthre d'Algérie est doté d'un grand pouvoir réducteur. Les extraits de *A. pyrethrum* L., qu'ils soient aqueux ou méthanolique, ont un pouvoir réducteur presque similaire ($p > 0.05$) où l' IC_{50} était de $0,66 \pm 0,05 \text{ mg/ml}$ et $0,63 \pm 0,065 \text{ mg/ml}$ respectivement. *A. absinthium* L. possède aussi un pouvoir réducteur similaire ($p > 0.05$) ($0.950 \pm 0.038 \text{ mg/ml}$ et $0.901 \pm 0.013 \text{ mg/ml}$ valeurs respectives des IC_{50} obtenues pour les extraits aqueux et alcoolique de cette plante). Par contre l'extrait aqueux de *U. urens* L. possède un pouvoir réducteur très bas ($\text{IC}_{50} = 2.610 \pm 0.3 \text{mg/ml}$) par rapport à l'extrait alcoolique ($\text{IC}_{50} = 0.186 \pm 0.006 \text{ mg/ml}$) ($p < 0.001$).

La toxicité des extraits aqueux et méthanolique de *A. pyrethrum* L., *A. absinthium* L. et *U. urens* L. sur des cellules CAD a été examinée à l'aide du test au MTT (bromure de 3-[4,5-diméthyl-2-thiazolyl]-2,5, diphényltétrazolium). Des concentrations de 0,1 à 0,0001 mg/ml d'extrait aqueux et méthanolique de *A. pyrethrum* L. et de *A. absinthium* L. n'ont provoqué aucun effet neurotoxique sur les cellules CAD. Concernant l'espèce *Urtica urens* L., à des

concentrations de 0.1 à 1 mg/ml d'extrait méthanolique et aqueux, aucune neurotoxicité n'a été observée chez les cellules CAD ($p > 0.05$).

Des études épidémiologiques ont établi un lien entre l'adhésion à des régimes alimentaires sains comme les régimes japonais et méditerranéens à un risque moindre de maladies neurodégénératives (Hu et al., 2013). Compte tenu de l'implication des ROS dans les maladies neurodégénératives, les recherches se sont concentrées sur les effets bénéfiques potentiels des composés antioxydants naturels, en raison de leur capacité à inhiber la génération de ROS et à protéger les cellules neuronales des dommages oxydatifs ou de la mort. Les effets des différents extraits végétaux sur le peroxyde d'hydrogène au sein des cellules CAD ont été étudiés. Un effet neuroprotecteur clair ($p < 0.01$) a été observé avec l'extrait aqueux des racines de *A. pyrethrum* L. à la concentration de 0.1mg/ml, en revanche aucun effet de cet extrait n'a été remarqué à la concentration de 0.01mg/ml. Par ailleurs, les extraits aqueux et méthanoliques des feuilles de *A. absinthium* L. et de *U. urens* L. n'ont montré aucun effet neuroprotecteur ($p > 0.05$) sur les cellules CAD traitées au peroxyde d'hydrogène.

Par rapport au contrôle, l'extrait aqueux de *A. pyrethrum* L. (0.1mg/ml), était le seul des six extraits à générer une petite réponse fonctionnelle avec une modeste augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ après son injection. Par contre l'extrait méthanolique de pyrèthre n'a induit aucun effet sur la concentration intracellulaire du calcium. Contrairement à l'extrait méthanolique qui a significativement supprimé la réponse à la dépolarisation, l'extrait aqueux semble étendre cette dernière. Cependant, l'extrait aqueux de *A. pyrethrum* L. semblait augmenter l'effet de la dépolarisation. Les cellules CAD traitées avec un extrait aqueux de pyrèthre produisaient un effet de dépolarisation plus important (environ 50%) supérieur à celui du contrôle (environ 25%). Il est possible que l'extrait aqueux, en augmentant la réponse dépolarisante, puisse augmenter de façon différentielle la libération de neurotransmetteurs inhibiteurs, par exemple le GABA, ce qui peut expliquer la capacité neuroprotectrice de cet extrait. De plus, un temps de réponse égal à 200 secondes pour le contrôle contre 220 secondes pour l'extrait aqueux de pyrèthre a été observé. Ce dernier aspect est peut-être aussi lié à sa propriété neuroprotectrice.

En comparant avec le contrôle, les extraits aqueux et méthanolique de *A. absinthium* L. (0.1mg/ml) ne semblaient avoir aucun effet sur la réponse calcique. Par ailleurs, les extraits aqueux et méthanolique de *A. absinthium* L. (0.1mg/ml) comme l'extrait méthanolique de *A. pyrethrum* L. avaient totalement supprimé la réponse à la dépolarisation induite par le KCl par rapport au contrôle. Par ailleurs, l'extrait aqueux de *U. urens* L. (0,1 mg/ml) a généré une réponse fonctionnelle modeste avec une légère diminution du calcium intracellulaire. Ce même extrait a fortement réduit la réponse à la dépolarisation induite par le KCl par rapport au

contrôle. En comparaison avec le témoin, l'extrait méthanolique de *U. urens* L. (0,1 mg/ml) n'a eu aucun effet sur les taux de calcium intracellulaire mais il a un effet biphasique sur le contenu en calcium suite à la dépolarisation avec le KCL. On peut dire que l'extrait aqueux de *U. urens* L., même s'il ne possède pas des propriétés neuroprotectrices contre le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), il peut empêcher des entrées excessives des ions calcium dans les cellules neuronales.

Suite à la protection partielle des cellules CAD par l'extrait aqueux de *A. pyrethrum* L., la caractérisation biochimique des extraits aqueux et méthanolique de cette drogue paraissait être nécessaire afin de pouvoir détecter les molécules responsables de cette activité neuroprotectrice. L'analyse haute résolution LC-UV-MS/MS a révélé la détection de différentes classes de composés dans les extraits aqueux et méthanoliques de *A. pyrethrum* L. Les composés détectés comprenaient les acides aminés, les acides caféoylquiniques, la N-feruloyltyramine et les alcaloïdes.

En conclusion, L'extrait aqueux de *A. pyrethrum* L. a montré une protection partielle des cellules CAD contre le stress oxydatif *in vitro*. Toutefois, le pyrèthre d'Afrique connaît une forte dégradation suite à une surexploitation anarchique qui le menace d'extinction ; en effet, les plantules sont souvent arrachées avant d'atteindre le stade de production des graines, matériel indispensable pour la régénération naturelle de la plante. De plus, l'exploitation et la commercialisation de la plante sont entreprises par un circuit informel et opaque de ramasseurs, collecteurs, grossistes, revendeurs, industriels et exportateurs échappant au contrôle des autorités (Daoudi et al., 2014).

A vertical grey bar is positioned on the left side of the page, extending from the top to the bottom. A thin black horizontal line crosses the page near the top, intersecting the vertical bar.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Abdel-Wahhab, M.A., Said, A., Huefner, A. 2005. NMR and Radical Scavenging Activities of Patuletin from *Urtica urens*. Against Aflatoxin B1. *Pharmaceutical Biology*, 43 : 515–525.
- Abou-Ghali, M., Stiban, J. 2015. Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22 : 760–772.
- Abuhamad, R. 2014. Chemical, molecular pharmacology and neuroprotective properties of the essential oil derived from *Aloysia citrodora* Palau, Durham theses, Durham University. Available at Durham E-Theses Online: <http://etheses.dur.ac.uk/10663/>.
- Abu-Rabia A. 2012. Ethno-Botanic Treatments for Paralysis (Fali) in the Middle East. *Chinese Medicine*, 3: 157-166.
- Agnivesha, C. S. 2011. Commentary: Vidyotini by Kasinatha Sashtri and Gorakha Natha Chaturvedi, *Chikitsa-sthan* volume-II, chapter 2/4, verse no 36. Chaukhambha Bharati Academy Varanasi.
- Agrawal, M., Kumar, V., Kashyap, M. P and al. 2011. Ischemic insult induced apoptotic changes in PC12 cells: protection by trans resveratrol. *European Journal of Pharmacology*, 666: 5–11.
- Agrawal, S. S., Gullaiya, S., Dubey, V. et al. 2012. Neurodegenerative Shielding by Curcumin and Its Derivatives on Brain Lesions Induced by 6-OHDA Model of Parkinson's Disease in Albino Wistar Rats. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*, 2012: 1–8.
- Ahmad, W., Hasan, A., Adullah, A., Tarannum, T. 2010. Medicinal importance of *Artemisia absinthium* Linn (Afsanteen) in Unani medicine: a review. *Hippocratic J .Unani .Med.*, 5: 117-125.
- Ahn, S.H., Kim, H.J., Jeong, I. et al. 2011. Grape seed proanthocyanidin extract inhibits glutamate-induced cell death through inhibition of calcium signals and nitric oxide formation in cultured rat hippocampal neurons. *BMC Neurosci.*, 12:78.
- Akkol, E. K., Orhan, I.O., Yesilada, E. 2012. Anticholinesterase and antioxidant effects of the ethanol extract, ethanol fractions and isolated flavonoids from *Cistus laurifolius* L. Leaves. *Food Chemistry*, 131: 626–631.
- Al Doghather, H. A ., Omar, U. M., Rahimulddin, S. A., Al-Ghafari, A. B. 2016. Cytotoxic Effects of Aqueous Extracts of *Urtica urens* on Most Common Cancer Types in Saudi Arabia. *J. Biol. Sci.*, 16: 242-246.
- Alonso-Castro, A., Miranda, A., González-Chávez, M. 2008. Cecropia obtusifolia and its active compounds, chlorogenic acid, stimulate 2-NBDglucose uptake in both insulin-sensitive and insulin-resistant 3T3 adipocytes. *J. Ethnopharmacol.*, 120 : 458–464.
- Althaus, J.B., Malyszczek, C., Kaiser, M. et al. 2017. Alkamides from *Anacyclus pyrethrum* L. and Their in Vitro Antiprotozoal Activity . *Molecules*, 22 : 796.
- Altunkaynak, Y., Demir, N., Ertem, D.H. et al. 2017. Neuropsychiatric Symptoms due to *Artemisia Absinthium* Poisoning. *Turkish Journal of Neurology*, 23 : 84-85.
- Alshibly, N.M.Y. 2014. Effect of *Artemisia absinthium* L. on Genotoxicity on Mice Bone Marrow Cells .*World Applied Sciences Journal*, 30: 770-777.
- Al-Yafaeaa, Y., Alansary, A., Haq, S.H. 2014. Neuroprotective role of glutathione against hydrogen peroxide induced toxicity to the neuronal cells in culture. *Int.J .Sci. Basic .Appl. Res.*, 13:411-425.

- Amat, N., Upur, H., Blazeković, B. 2010. In vivo hepatoprotective activity of the aqueous extract of *Artemisia absinthium* L. Against chemically and immunologically induced liver injuries in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 131:478-484.
- Amrita, M., Arun, K.M., Ashoke, K.G., Shivesh, J. 2011. Pharmacognostical, Physicochemical and Phytochemical Studies of Some Marketed Samples of Roots used in Ayurvedic Medicines. *Pharmacognosy Journal*, 3: 55-61.
- Anderson, J.W., Johnstone, B.M., Cook-Newell, M.E. 1995. Meta-Analysis of the Effects of Soy Protein Intake on Serum Lipids. *N. Engl. J. Med.*, 333:276-282.
- Anderson, R.A., Qin, B., Canini, F. et al. 2013. Cinnamon Counteracts the Negative Effects of a High Fat/High Fructose Diet on Behavior, Brain Insulin Signaling and Alzheimer-Associated Changes. *PLoS ONE*, 8: e83243.
- Angelova, P.R., Abramov, A.Y. 2018. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Lett.*, 592 : 692–702.
- Ankri, J., Van Broeckhoven, C. 2013. Evaluation du plan Alzheimer 2008-2012. Ministère des solidarités et de la santé. <https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport-evaluation-plan-alzheimer-2012>.
- Annalakshmi, R., Uma, R., Subash Chandran, G., Muneeswaran, A. 2012. A treasure of medicinal herb-*Anacyclus pyrethrum*. *Indian Journal of Drugs and Diseases*, 1: 59-67.
- Arantes, F.P., Savassi, L.A., Santos, H.B. et al. 2016. Bioaccumulation of mercury, cadmium, zinc, chromium, and lead in muscle, liver, and spleen tissues of a large commercially valuable catfish species from Brazil. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 88: 137–147.
- Arora, A., Nair, M.G., Strasburg, G.M. 1998. Structure activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic. Biol.*, 24:1355-1363.
- Arundine, M., Tymianski, M. 2003. Molecular mechanisms of calcium dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, 34: 325–337.
- Asada, K. 2000. The water–water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 355:1419- 1431.
- Assiri, A.M., Elbanna, K., Abulreesh, H.H., Ramadan, M.F. 2016. Bioactive compounds of cold-pressed thyme (*Thymus vulgaris*) oil with antioxidant and antimicrobial properties. *J. Oleo .Sci.*, 65:629-640.
- Atwell, D., Buchan, A.M., Charpak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B.A., Newman, E.A., 2010. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*, 468: 232–243.
- Auhman, A. 1995. Contribution à l'étude chimique et pharmacologique d'*Anacyclus pyrethrum* DC. Thèse de 3eme Cycle, Faculté des Sciences Semalia, Marrakech, 12-15.
- Avallone, R., Zanolli, P., Puia, G. et al. 2000. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. *Biochem. Pharmacol.*, 59, 1387–1394.
- Avramovich-Tirosh, Y., Reznichenko, L., Amit, T. et al. 2007. Neurorescue activity, APP regulation and amyloid- β peptide reduction by novel multi-functional brain permeable iron-chelating antioxidants, M-30 and green tea polyphenol, EGCG. *Current Alzheimer Research*, 4: 403–411.
- Azzi, R., Djaziri, R., Lahfa, F., Sekkal, F.Z., Benmehdi, H., Belkacem, N. 2012. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Medicinal Plants Research*, 6: 2041-2050.

B

- Bachs, O., Agell, N., Carafoli, E. 1994. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in the nucleus. *Cell Calcium*, 16:289-296.
- Badhe, S.R., Badhe, R.V., Ghaisas, M.M., Chopade, V.V., Deshpande, A.D. 2010. Evaluations of antidepressant activity of *Anacyclus pyrethrum* root extract. *Int. J. Green. Pharm.*, 4: 79-82.
- Bagdas, D., Etoz, B.C., Gul, Z. et al. 2015. In vivo systemic chlorogenic acid therapy under diabetic conditions : Wound healing effects and cytotoxicity/ genotoxicity profile. *Food Chem. Toxicol.*, 81: 54–61.
- Bahi, A., Al Mansouri, S., Al Memari, E., Al Ameri, M., Nurulain S.M., Ojha, S. 2014. β -caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. *Physiol. Behav.*, 135: 119-124.
- Bakoyiannis, I., Gkioka, E., Daskalopoulou, A., Korou, L.M., Perrea, D., Pergialiotis, V. 2015. An explanation of the pathophysiology of adverse neurodevelopmental outcomes in iron deficiency, *Rev. Neurosci.*, 26: 479–488.
- Bakoyiannis, I., Daskalopoulou, A., Pergialiotis, V., Perrea, D. 2019. Phytochemicals and cognitive health: Are flavonoids doing the trick? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109: 1488–1497.
- Baldi, I., Lebailly, P., Mohammed-Brahim, B et al. 2003. Neurodegenerative Diseases and Exposure to Pesticides in the Elderly. *American Journal of Epidemiology*, 157: 409-414.
- Ban, J.Y., Nguyen, H.T., Lee, H.J. et al. 2008. Neuroprotective properties of gallic acid from *Sanguisorba radix* on amyloid beta protein (25–35)- induced toxicity in cultured rat cortical neurons. *Biol. Pharm. Bull.*, 31:149–153.
- Barkaoui, T., Kacem, R., Guesmi, F. et al. 2017. Evaluation of antibacterial and antioxidant properties of *Urtica urens* extract tested by experimental animals. *Int. J. Pharmacol.*, 13 : 332-339.
- Bastianetto, S., Caroline Ménard, C., Quirion, R. 2015. Neuroprotective action of resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852: 1195–1201.
- Bautista, D.M., Movahed, P., Hinman, A. et al. 2005. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:12248-12252.
- Baxter, P. S., Hardingham, G. E. 2016. Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes. *Free Radical Biology and Medicine* 100: 147–152.
- Baytop. 1984. *Therapy with Medicinal Plants in Turkey*. Istanbul University Press, Istanbul, 166:16.
- Beigh, Y.A., Ganai, A.M. 2017. Potential of Wormwood (*Artemisia absinthium* Linn.) herb for use as additive in livestock feeding: A review. *The Pharma Innovation*, 6: 176-187.
- Bendjedou, D., Lalaoui, K., Satta, D. 2003. *J. Ethnopharmacol.*, 88, 155-160.
- Benitez, G., Gonzalez-Tejero, M.R., Molero-Mesa, J. 2010. Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain). *Ethnopharmacological synthesis. J. Ethnopharma.*, 129: 87–105.
- Bernardi, P. 2013. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Front Physiol.*, 4:95.
- Bhattacharjee, A., Datta, A., 2015. Mechanism of antiglycating properties of syringic and chlorogenic acids in in vitro glycation system. *Food Res. Int.*, 77: 540–548.
- Bhat, M.Y., Gul, M.Z., Lohamror, L.R. et al. 2018. An in vitro Study of the Antioxidant and Antiproliferative Properties of *Artemisia absinthium*- a potent medicinal plant. *Free Radicals and Antioxidants*, 8:18-25.
- Bhullar, K.S., Rupasinghe H.P.V. 2013. Polyphenols: Multipotent Therapeutic Agents in Neurodegenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1- 18.

- Bi, Y., Qu, P.C., Wang, Q.S. et al. 2015. Neuroprotective effects of alkaloids from Piper longumin a MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. *Pharmaceutical Biology*, 53: 1516–1524.
- Blancaflor, E. B., Kilaru, A., Keereetawee, J., Khan, B. R., Faure, L., Chapman, K. D. 2014. N-Acylethanolamines: lipid metabolites with functions in plant growth and development. *The Plant Journal*, 79: 568–583.
- Blasco, H., Garcon, G., Patin, F., Veyrat-Durebex, C et al. 2017. Panel of oxidative stress and inflammatory biomarkers in ALS: a pilot study, *Can. J. Neurol. Sci.*, 44: 90–95.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181:1199–1200.
- Blumenthal, M., Busse, W.R., Goldberg, A. et al. 1998. eds. Austin, TX: American Botanical Council. The complete German Commission E monographs: therapeutic guide to herbal medicines.
- Bong, A. H. L., Monteith, G. R. 2018. Calcium signaling and the therapeutic targeting of cancer cells. *BBA - Molecular Cell Research*, 1865: 1786–1794.
- Bora, K.S., Sharma, A. 2010a. Neuroprotective effect of *Artemisia absinthium* L. on focal ischemia and reperfusion-induced cerebral injury. *J. Ethnopharmacol.*, 129: 403-409.
- Bora, K.S., Sharma, A. 2010b. Phytochemical and pharmacological potential of *Artemisia absinthium* Linn. and *Artemisia asiatica* Nakai: a review. *J. Pharm. Res.*, 3:325-328.
- Bora, K.S. Sharma, A. 2011. Evaluation of antioxidant and free-radical scavenging potential of *Artemisia absinthium*. *Pharmaceutical Biology*, 49: 1216-1223.
- Boonen, J., Bronselaer, A., Nielandt, J. et al. 2012. Alkamid database: chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides. *J. Ethnopharmacol.*, 142:563–590.
- Boonen, J., Sharma, V., Dixit, V. et al. 2012. LC-MS N-alkylamide Profiling of an Ethanolic *Anacyclus pyrethrum* Root Extract. *Planta Medica*, 78: 1787–1795.
- Boonen, J., Sharma, V., Dixit, V., De Spiegeleer, B. 2011. New N-alkylamides from *Anacyclus pyrethrum*. *Planta Med.*, 77 :94.
- Bootman, M. D., Rietdorf, K., Hardy, H. et al. 2012. Calcium Signalling and Regulation of Cell Function. In : eLS. John Wiley & Sons, Ltd : Chichester.
- Bouguerne, B. 2012. Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose). Thèse université de toulouse.
- Bournival, J., Plouffe, M., Renaud, J. et al. 2012. Quercetin and Sesamin Protect Dopaminergic Cells from MPP⁺-Induced Neuroinflammation in a Microglial (N9)-Neuronal (PC12) Coculture System. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–11.
- Bousselessela, H., Yahia, M., Mahboubi, A., Benbia, S., Yahia, M. 2013. Antioxydant and Antibacterial Activity of Alkaloids and Terpenes Extracts from *Euphorbia granulata*. *International Journal of Bioengineering and Life Sciences*, 7:166-169.
- Braca, A., Fico, G., Morelli, I., Simone, F., Tom, F., De Tommasi, N. 2003. Antioxidant and free radical scavenging activity of flavonol glycosides from different *Aconitum* species. *J. Ethnopharmacol.*, 86:63-67.
- Brown, R. C., Lockwood, A. H., Sonawane, B. R. 2005. Neurodegenerative Diseases: An Overview of Environmental Risk Factors, *Environ. Health Perspect*, 1250 : 1250-1256.
- Brickman, A.M., Khan, U.A., Provenzano, F.A. et al. 2014. Enhancing dentate gyrus function with dietary flavanols improves cognition in older adults. *Nat. Neurosci.*, 17 : 1798-1803.
- Brini, M., Cali, T., Ottolini, D., Carafoli, E. 2014. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cell. Mol. Life Sci.* 71 : 2787–2814.
- Burg, T. 2017. Les maladies neurodégénératives. Planet-Vie.

<https://planetvie.ens.fr/article/2383/maladies-neurodegeneratives>.

- Burton, M.D., Rytych, J.L., Amin, R. et al. 2016. Dietary luteolin reduces proinflammatory microglia in the brain of senescent mice. *Rejuvenation Res.*, 19:286–292.
 - Butiuk, A.P., Martos, M.A., Adachi, O., Hours, R.A., 2016. Study of the chlorogenic acid content in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Effect of plant fraction, processing step and harvesting season. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*, 3: 27–33.
 - Butterfield, D.A., Lauderback, C.M. 2002. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 32: 1050–1060.
 - Butterfield, D.A. 2014. The 2013 SFRBM discovery award: selected discoveries from the butterfield laboratory of oxidative stress and its sequela in brain in cognitive disorders exemplified by Alzheimer disease and chemotherapy induced cognitive impairment, *Free Radic. Biol. Med.*, 74 : 157–174.
 - Buyck, J. 2008. Rôles du calcium et des transports ioniques de l'épithélium des voies aériennes dans la réponse à l'agression septique par *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse.
- C**
- Canadanovic-Brunet, J.M., Djilas, S.M., Cetkovic, G.S. et al. 2005. Free-radical scavenging activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L) extracts. *J. Sci. Food Agric.*, 85: 265- 272.
 - Capiod, T., Méry, P.F., Pacaud, P., Takeda, K. 1995. Des portes s'ouvrent sur les allées et venues des ions calcium. *mfdnlnl/sril'llffS*, 11 : 1027-1033.
 - Carvalho, A. R., Costa, G., Figueirinha, A. et al. 2017. *Urtica* spp.: Phenolic composition, safety, antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Research International*, 99: 485-494.
 - Castegna, A., Lauderback, C.M., Mohmmad-Abdul, H. et al. 2004. Modulation of phospholipid asymmetry in synaptosomal membranes by the lipid peroxidation products, 4-hydroxynonenal and acrolein: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res.*, 1004: 193-197.
 - Catterall, W.A., Few, A.P. 2008. Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron*, 59:882-901.
 - Cavet, M. E., Harrington, K. L., Vollmer, T. R et al 2011. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate in human corneal epithelial cells. *Molecular Vision*, 17: 533–542.
 - CCD: Combined Chemical Dictionary Online (CCD 22.1) <http://ccd.chemnetbase.com/dictionary>. Taylor & Francis Group. Retrieved 24/10/2018.
 - Cech, N.B., Eleazer, M.S., Shoffner, L.T. et al. 2006. Crosswhite MR, Davis AC, Mortenson AM. High performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for simultaneous analysis of alkaloids and caffeic acid derivatives from *Echinacea purpurea* extracts. *J. Chromatogr.*, 1103 : 219–228.
 - Chaaib, F. 2004. Investigation phytochimique d'une brosse à dents africaine *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick & Timler (syn. *Fagara zanthoxyloides* L.) (Rutaceae). Thèse de doctorat, Université de Lausanne, 200 p.
 - Chan, P.H., 2001. Reactive oxygen radicals in signalling and damage in the ischemic brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21: 2–14.
 - Chandran, R., Kumar, M., Kesavan, L. et al. 2019. Cellular calcium signaling in the aging brain *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 95: 95–114.
 - Chay, K.O., Nam Koong, K.Y., Hwang, S., Kim, J.K., Bae, C.S. 2017. NADPH oxidase mediates β -amyloid peptide-induced neuronal death in mouse cortical cultures, *Chonnam Med. J.*, 53: 196.

- Chen, Q.B., Gao, J., Zou, G.A. et al. 2018. Piperidine Alkaloids with Diverse Skeletons from *Anacyclus pyrethrum*. *Journal of Natural Products*, 81:1474–1482.
 - Chen, W.W., Zhang, X., Huang, W.J. 2016. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review), *Mol. Med. Rep.*, 13 : 3391–3396.
 - Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D et al. 2018. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*, 14: 450-464.
 - Cherrat, A., Amalich, S., Regragui, M., Bouzoubae, A., Elamrani, M., Mahjoubi, M., Bourakhouadar, M., Zair, T.2017. Polyphenols content and evaluation of antioxidant activity of *Anacyclus pyrethrum*(L.) Lag. from Timahdite a Moroccan Middle Atlas region. *Int. J .Adv. Res.*, 5: 569-577.
 - Chicca, A., Raduner, S., Pellati, F., Strompen, T., Altmann, K.-H., Schoop, R., Gertsch, J. 2009. Synergistic immunopharmacological effects of N-alkylamides in *Echinacea purpurea* herbal extracts. *International Immunopharmacology*, 9: 850–858.
 - Cho, J.Y., Kim, J.Y., Lee, Y.G. et al.2016. Four New Dicafeoylquinic Acid Derivatives from Glasswort (*Salicornia herbacea* L.) and Their Antioxidative Activity. *Molecules*, 21 : 1097.
 - Choi, E.H., Kang, J.I., Cho, J.Y. et al. 2012. Supplementation of standardized lipid-soluble extract from maca (*Lepidium meyenii*) increases swimming endurance capacity in rats. *Journal of Functional Foods*, 4:568–573.
 - Choi, D. W. J.1992. *Neurobiol.*, 23, 1261-1276.
 - Choi, B.H., Choi, J.S., Min, D.S. et al .2001. Effects of (–)-epigallocatechin-3-gallate, the main component of green tea, on the cloned rat brain Kv1.5 potassium channels. *Biochem. Pharmacol*, 62 : 527-535 .
 - Clapham, D.E.2007. Calcium Signaling. *Cell*, 131: 1047-1058.
 - Clifford, M. N., Jaganath, I. B., Ludwig, I. A., Crozier, A. 2017. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Natural Product Reports*, 34: 1391–1421.
 - Cobley, J. N., Fiorello, M. L., Bailey, D. M. 2018. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biology*, 15: 490–503.
 - Corona, G., Vauzour, D. 2017. Neuroprotective Effects of Polyphenols in Aging and Age-Related Neurological Disorders. *Neuroprotective Effects of Phytochemicals in Neurological Disorders*, 65–78.
 - Costa, L.G., Garrick, J. M., Roquè, P. J., Pellacani, C. 2016. Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–10.
 - Cox, C.J., Choudhry, F., Peacey, E. et al. 2015. Dietary (–)-epicatechin as a potent inhibitor of beta gamma-secretase amyloid precursor protein processing. *Neurobiol. Aging*, 36 : 178-187.
 - Craciunescu, O., Constantin, D., Gaspar, A. et al.2012. Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. ethanolic extracts. *Chemistry Central Journal*, 6:1-11.
 - Csordas, G., Hajnoczky, G. 2009. SR/ER-mitochondrial local communication: Calcium and ROS. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1787:1352-1362.
- D**
- Dajas, F., Rivera-Megret, F., Blasina, F et al. 2003. Neuroprotection by flavonoids .*Brazilian Journal of Medical and Biological Research*,1613-1620.
 - Damier, P., Hirsch, E.C., Agid, Y., Graybiel, A.M. 1999. The substantia nigra of the human brain. I. Nigrosomes and the nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D(28K) immunohistochemistry. *Brain*, 122 : 1421–1436.

- Daoudi, A., Nassiri, L., Ibijbijen, J., Boukil, A. 2014. Etude ethnobotanique du Pyrèthre d'Afrique " *Anacyclus pyrethrum* L." dans le cercle Meknès, El Hajeb, Khénifra, Azrou et Ifrane, Maroc. *Science Lib.*, 6 : 26.
 - Daoudi, A., Bammou, M., Ibijbijen, J., Nassiri, L. 2017. Antibacterial Activity of Aqueous Extracts of *Anacyclus Pyrethrum* (L) Link and *Corrigiola Telephiifolia* Pourr. From the Middle Atlas Region-Morocco. *European Scientific Journal*, 13.
 - Daoudi, A., Sabiri, M., Bammou, M et al. 2015. Valorisation des extraits de trois espèces du genre *Urtica* : *Urtica urens* L., *Urtica membranacea* Poir et *Urtica pilulifera* L. *Journal of Applied Biosciences*, 87 : 8094– 8104.
 - Datla, K.P., Christidou, M., Widmer, W.W. et al. 2001. Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus flavonoid tangeretin in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroreport*, 12 : 3871-3875.
 - Dausset, J. 1976. Cytotoxicité à médiation cellulaire. Le Complexe H. L. A. La Nouv. presse méd., 22 : 1414.
 - De Almeida, L.M.S., de Carvalho, L.S.A., Gazolla, M.C. et al., 2016. Flavonoids and Sesquiterpene Lactones from *Artemisia absinthium* and *Tanacetum parthenium* against *Schistosoma mansoni* Worms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-9.
 - Degos, V., Chhor, V., Gressens, P., Mantz, J. 2009. Neuro-inflammation aiguë et stratégies neuroprotectrices. *Réanimation*, 18 : 556-565.
 - Del Rio, D., Rodrigues-Mateos, A., Spencer, J. P. E. et al. 2013. Antioxid. Redox Signaling, 18 : 1818-1892.
 - Demaurex, N., Rosselin, M. 2017. Redox Control of Mitochondrial Calcium Uptake. *Molecular Cell*, 65: 961-962.
 - Deng, X.Y., Li, H.Y., Chen, J.J., et al. 2015. Thymol produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in mice. *Behav. Brain Res.*, 291:12-19.
 - Denton, R.M. 2009. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1787: 1309–1316.
 - De Stefani, D., Rizzuto, R., Pozzan, T. 2016. *Annu. Rev. Biochem.* 85 : 161–192.
 - Dingleline, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S. 1999. *Pharmacol. Rev.*, 50: 7-61.
 - Dong, Z., Shanmughapriya, S., Tomar, D. et al. 2017. *Mol. Cell.*, 65: 1014–1028.
 - Doukkali, Z., Boudida, H., Srfi, A. et al. 2014. Anxiolytic plants in Morocco: Ethnobotanical and ethno-pharmacological study. *Phytothérapie*, 13 : 306–313.
 - Doukkali, Z., Taghzouti, K., Boudida, E.H. et al. 2015. Evaluation of anxiolytic activity of methanolic extract of *Urtica urens* in a mice model. *Behavioral and Brain Functions*, 11:1-5.
 - Dreses-Werringloer, U., Lambert, J.C., Vingtdoux, V. et al. 2008. A polymorphism in CALHM1 influences Ca²⁺ homeostasis, Aβ levels, and Alzheimer's disease risk. *Cell.*, 133:1149–1161.
 - Du, G. X. 2011. Study on the Isolation, Purification and Antioxidant Activities of Alkaloids in Maca, South China University of Technology, Guangzhou, China.
- E
- Earley, S., Heppner, T.J., Nelson, M.T., Brayden, J.E. 2005. TRPV4 forms a novel Ca²⁺ signaling complex with ryanodine receptors and BKCa channels. *Circ Res.*, 97: 1270-1279.
 - Efrain, L., A. Zohar, 2008. "Fossils" of practical medical knowledge from medieval Cairo. *J. Ethnopharma.*, 119 : 24-40.

- Egea, J., Martín-de-Saavedra, M.D., Parada, E. et al. 2012. Galantamine elicits neuroprotection by inhibiting iNOS, NADPH oxidase and ROS in hippocampal slices stressed with anoxia/ reoxygenation. *Neuropharmacology*, 62: 1082-1090.
- Elazzouzi, H., Soro, A., Elhilali, F., Bentayeb, A., El Belghiti, M.A., Zair, T. 2014. Phytochemical study of *Anacyclus pyrethrum* (L.) of Middle Atlas (Morocco), and in vitro study of antibacterial activity of pyrethrum. *Adv. in Nat. Appl. Sci.*, 8: 131-140.
- Elliott, M.S.J., Abuhamdah, S., Howes, M-JR et al. 2007. The essential oils from *Melissa officinalis* L. and *Lavandula angustifolia* Mill. as potential treatment for agitation in people with severe dementia. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 1: 143-152.
- El-Seadawy, H.M., Abo El-Seoud, K.A., Kabbash, A.M. et al. 2018. Phytochemicals and biological investigation of *Urtica urens* L. Growing in Egypt. *Int. Res. J. Pharm.*, 9:25-35.
- Emerit, J., Edeas, M. Bricaire, F. 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58: 39-46.
- EPA. 2018. <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/pyrethrins-and-pyrethroids>.
- Esfahani, A., Wong, J.M., Truan, J et al. 2011. Health effects of mixed fruit and vegetable concentrates: a systematic review of the clinical interventions. *J. Am. Coll. Nutr.*, 30: 285-294.
- European Scientific Cooperative of Phytotherapie, Second Edition, New York, Ed. ESCOP Exter>V Stuttgart & TNY, 2003: 521-527.

F

- Falleh H, Ksouri R, Chaieb K et al. 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331: 372-379.
- Faller, P., Hureau, C. 2012. A bioinorganic view of Alzheimer's disease: when misplaced metal ions (re)direct the electrons to the wrong target, *Chemistry* 18: 15910–15920.
- Farag, M.A., Weigend, M., Luebert, F., Brokamp, G., Wessjohann, L.A. 2013. Phytochemical, phylogenetic, and anti-inflammatory evaluation of 43 *Urtica* accessions (stinging nettle) based on UPLC–Q-TOF-MS metabolomic profiles. *Phytochemistry* 96: 170-183.
- Farooqui, A. A. 2010. *Neurochemical Aspects of Neurodegenerative Diseases. Neurochemical Aspects of Neurotraumatic and Neurodegenerative Diseases.* Springer.
- Fattahi, S., Zabih, E., Abedian, Z. et al. 2014. Total Phenolic and Flavonoid Contents of Aqueous Extract of Stinging Nettle and In Vitro Antiproliferative Effect on Hela and BT-474 Cell Lines. *Int. J. Mol. Cell. Med.* 3:1-6.
- Feissner, R.F., Skalska, J., Gaum, W.E., Sheu, S.S. 2009. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca^{2+} and ROS. *Front. Biosci.*, 1197–1218.
- Fernandez-Bueno, I., Fernandez-Sanchez, L., Gayoso, M.J., Garcia-Gutierrez, M.T., Pastor, J.C., Cuenca, N. 2012. Time course modifications in organotypic culture of human neuroretina. *Exp. Eye Res.*, 104:26-38.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M. et al. 2006. A mutation in *Orail* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function, *Nature*, 441:179–185.
- Forman, M. S., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. 2004. Neurodegenerative diseases : a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs, *Nature med.*, 10: 1055-1063.
- Freshney, R.I. 2011. Introduction. *Culture of animal cells.* Wiley, Hoboken, 1–10.
- Froestl, W., Muhs, A., Pfeifer, A. 2013. Cognitive enhancers (nootropics). Part 2: drugs interacting with enzymes, *J. Alzheimers Dis.* 33: 547–658.
- Fu, X., Zhang, J., Guo, L. et al. 2014. Protective role of luteolin against cognitive dysfunction induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 126: 122-130.

G

- Gan, J., Feng, Y., He, Z. et al. 2017. Correlations between Antioxidant Activity and Alkaloids and Phenols of Maca (*Lepidium meyenii*). *Journal of Food Quality*, 1-10.
- Gandhi, S., Abramov, A.Y. 2012. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 1-11.
- Gaschler, M.M., Stockwell, B.R. 2017. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 482 : 419–425.
- Gautam, O.P., Verma, S., Jain, S. K. 2011. Anticonvulsant and Myorelaxation Activity of *Anacyclus Pyrethrum* DC (Akarkara) Root Extract; *Pharmacologyonline*, 1: 121-125.
- Ghédira, K., Goetz, P. 2016. *Artemisia absinthium* L: absinthe (Asteraceae). *Phytothérapie*, 14:125-129.
- Ghourri M, Zidane L, Douira A, 2014. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement de la lithiase rénale dans la province de TanTan (Maroc saharien). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 7:1688-1700.
- Gleichmann, M., Mattson, M.P. 2011. Neuronal Calcium Homeostasis and Dysregulation. *Antioxydants & redox signaling*, 14:1261-1273.
- González-Sarrias, A., Núñez-Sánchez, M. Á., Tomás-Barberán, F. A., Espín, J. C. 2016. Neuroprotective Effects of Bioavailable Polyphenol-Derived Metabolites against Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65: 752–758.
- Greger, H. 2015. Alkamides: a critical reconsideration of a multifunctional class of unsaturated fatty acid amides. *Phytochemistry Reviews*.
- Grienberger, C., Konnerth, A. 2012. Imaging calcium in neurons. *Neuron*, 73:862-885.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem*, 260:3440 - 3450.
- Gu, F., Chauhan, V., Chauhan, A. 2015. Glutathione redox imbalance in brain disorders, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 18: 89–95.
- Gullledge, T. V., Collette, N. M., Mackey, E., Johnstone, S. E., Moazami, Y., Todd, D. A et al. 2018. Mast cell degranulation and calcium influx are inhibited by an *Echinacea purpurea* extract and the alkylamide dodeca-2E,4E-dienoic acid isobutylamide. *Journal of Ethnopharmacology*, 212, 166–174.
- Guo, Y., Hong, Y.J., Jang, H.J. et al. 2010. Octyl gallate inhibits ATP-induced intracellular calcium increase in PC12 cells by inhibiting multiple pathways. *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, 14: 21–28.

H

- Hajdu, Z., Nicolussi, S., Rau, M. et al. 2014. Identification of Endocannabinoid System-Modulating N-Alkylamides from *Heliopsis helianthoides* var. *scabra* and *Lepidium meyenii*. *Journal of Natural Products*, 77: 1663–1669.
- Hallal, N., Kharoubi, O., Benyettou, I., Tair, K., Ozaslan, M., Aoues, A.E.K. 2016. In vivo amelioration of oxidative stress by *Artemisia absinthium* L. administration on mercuric chloride toxicity in brain regions. *J. Biol. Sci.*, 16:167-177.
- Halliwell, B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.*, 97:1634–1658.
- Hans, W. K. 2007. 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terres éditions, Toulouse, 43.
- Haq, S.H., Al Amro, A.A. 2019. Neuroprotective effect of quercetin in murine cortical brain tissue cultures. *Clinical Nutrition Experimental*, 23: 89-96.
- Harald, G., 1978. Comparative phytochemistry and systematics of *Anacyclus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 6: 11–17.

- Hardiman, O., Doherty, C. P. 2011. *Neurodegenerative Disorders: A Clinical Guide*, Springer.
 - Hausser, M. 2000. The Hodgkin–Huxley theory of the action potential. *Nat. Neurosci* 3. Suppl.,1165.
 - Harish, G., Venkateshappa, C., Mythri, R.B et al. 2010. Bioconjugates of curcumin display improved protection against glutathione depletion mediated oxidative stress in a dopaminergic neuronal cell line: implications for Parkinson's disease. *Bioorg Med Chem.*,18:2631-2638.
 - He, C., Pan, Y., Ji, X., Wang, H.2012. Antioxidants: Introduction. *Antioxidant Polymers, Synthesis, Properties, and Applications*. Giuseppe Cirillo and Francesca lemma, 23-54.
 - Hedskog, L., Pinho, C.M., Filadi, R. et al. 2013. Modulation of the endoplasmic reticulum–mitochondria interface in Alzheimer’s disease and related models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ,110:7916–7921.
 - Heneka, M.T.; O’Banion, M.K.; Terwel, D.; Kummer, M.P. 2010. Neuroinflammatory processes in alzheimer’s disease. *J. Neural. Transm.*, 117: 919–947.
 - Hendrich, A.B.2006. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta . Pharmacol. Sin.*, 27, 27-40.
 - Hidalgo, C., Donoso, P., Carrasco, M.A.2005 .The ryanodine receptors Ca²⁺ release channels: cellular redox sensors? *IUBMB Life*, 57: 315-22.
 - Hmammouchi, M. 1999: *Les plantes médicinales et aromatiques marocaines*. Edition Imprimeries de Fédala, Rabat, Maroc, 389.
 - Holmstrom, K.M., Finkel, T. 2014. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15: 411–421.
 - Hosseini, M., Mohammadpour, T., Karami, R., Rajaei, Z., Sadeghnia, H.R., Soukhtanloo, M. 2014. Effects of the hydro-alcoholic extract of *Nigella sativa* on scopolamine-induced spatial memory impairment in rats and its possible mechanism. *Chin. J .Integr. Med.*, 1-7.
 - Hrycay, E.G., Bandiera, S.M. 2015. Involvement of cytochrome P450 in reactive oxygen species formation and cancer. *Adv. Pharmacol.*, 74: 35–84.
 - Hu, N., Yu, J. T., Tan, L. 2013. Nutrition and the risk of Alzheimer’s diseases. *Bio.Med. Res. Int.*, 524820.
 - Hudmon, A., Schulman, H. 2002. Neuronal CA²⁺/calmodulindependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem* 71:473–510.
 - Humbert , J.P. , Köppler, P. , Matter, N. et al .1995. Le signal calcium dans la cellule : l’enveloppe nucléaire est-elle un réservoir à calcium ?. *médecine/sciences*, 11 : 1437-1441.
 - Hurd, M.D., Martorell, P., Delavande, A., Mullen, K.J., Kenneth, M., Langa, M.D. 2013. Monetary Costs of Dementia in the United States. *N .Engl. J .Med.*, 368:1326-1334.
- I**
- Iriti, M., Vitalini, S., Fico, G., Faoro, F. 2010. Neuroprotective herbs and foods from different traditional medicines and diets. *Molecules*, 15:3517-3555.
 - Ivanescu, B. 2010. Phytochemical study of compounds from *Artemisia absinthium*, *Artemisia vulgaris* and *Artemisia annua* species harvested from spontaneous flora; PhD thesis,14
- J**
- Jang, S., Kelley, K.W., Johnson, R.W. 2008. Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105:7534–7539.

- Jaradat, N., Zaid, A.N., Zaghal, E.Z.2017. Anti-lipase activity for *Portulaca oleracea*, *Urtica urens*, *Brassica napus* and *Lathyrus hierosolymitanus* wild plants from Palestine. *Marmara Pharm. J.*, 21 : 828-836.
- Jaronen, M., Vehvilainen, P., Malm, T et al.2013. Protein disulfide isomerase in ALS mouse glia links protein misfolding with NADPH oxidase-catalyzed superoxide production. *Hum. Mol. Genet.*, 22:646–655.
- Jenner, P. 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 53:26-36.
- Jiang, R., Hodgson, J.M., Mas, E. et al. 2016. Chlorogenic acid improves ex vivo vessel function and protects endothelial cells against HOCl-induced oxidative damage, via increased production of nitric oxide and induction of Hmox-1. *J. Nutr. Biochem.*, 27: 53–60.
- Jimoh, F., Adedapo, A., Aliero, A., Afolayan, A.2010. Polyphenolic and biological activities of leaves extracts of *Argemone subfusiformis* (Papaveraceae) and *Urtica urens* (Urticaceae). *Rev. Biol. Trop.*, 58: 1517-1531.
- Jomova, K., Valko, M. 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283: 65–87.
- Jovanovic, S.V., Steenken, S., Hara, Y., Simic, M.G.1996. Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidative activity? *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2:2497–2504.

K

- Kairisalo, M., Bonomo, A., Hyrskyluoto, A. et al. 2011. Resveratrol reduces oxidative stress and cell death and increases mitochondrial antioxidants and XIAP in PC6.3-cells. *Neuroscience Letters*, 488: 263–266.
- Kalam, M.A., Karim, M.S., Anzar, M.A. et al.2015. Aqer qerha (*Anacyclus pyrethrum* DC.) a nobel drug of Unani system of medicine-a review. *Int. J. Pharmacognosy*, 2: 116-22.
- Kalim et al.2010. Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of plants used in Unani system of medicine. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10:77.
- Kamsler, A., Segal, M.2004. Hydrogen peroxide as a diffusible signal molecule in synaptic plasticity. *Mol. Neurobiol.*, 29:167-178.
- Kanada, A., Nishimura, Y., Yamaguchi, J.Y. et al. 2005. Extract of *Ginkgo biloba* Leaves Attenuates Kainate-Induced Increase in Intracellular Ca^{2+} Concentration of Rat Cerebellar Granule Neurons. *Biol. Pharm. Bull.*, 28: 934-936.
- Kanchiswamy, C.N., Malnoy, M., Occhipinti, A., Maffei, M.E. 2014. Calcium Imaging Perspectives in Plants. *Int. J. Mol. Sci*, 15, 3842-3859.
- Kataki, M.S., Murugamani, V., Rajkumari, A. et al. 2012. Antioxidant, Hepatoprotective and Anthelmintic Activities of Methanol Extract of *U. dioica* L. Leaves. *Pharm. Crops*, 3:38-46.
- Katsuyama, S., Mizoguchi, H., Kuwahata, H., Komatsu, T., Nagaoka, K., Nakamura, H., Bagetta, G., Sakurada, T., Sakurada, S. 2013. Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in β -caryophyllene- induced antinociception. *Eur. J. Pain.*, 17: 664-675.
- Kesse-Guyot, E., Fezeu, L., Andreeva, V.A. et al. 2012. Total and specific polyphenol intakes in midlife are associated with cognitive function measured 13 years later. *J. Nutr.*, 142:76–83.
- Kifleyohannes, T., Terefe, G., Tolossa, Y.T., Giday, M., Kebede, N.2014. Effect of crude extracts of *Moringa stenopetala* and *Artemisia absinthium* on parasitaemia of mice infected with *Trypanosoma congolense* Tsegabirhan. *BMC Research Notes*, 7:1-7.

- Kita, Y., Ago, Y., Higashino, K. et al. 2014. Galantamine promotes adult hippocampal neurogenesis via M₁ muscarinic and α7 nicotinic receptors in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 17 : 1957-1968.
 - Kharoubi, O., Slimani, M., Aoues, A., Seddik, L.2008.Prophylactic effects of Wormwood on lipid peroxidation in an animal model of lead intoxication. *Indian J. Nephrol.*,18: 51-57.
 - Khazdair, M.R., Anaeigoudari, A., Hashemzahi, M.et al. 2018. Neuroprotective potency of some spice herbs, a literature review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 9:98-105.
 - Khazdair, M.R., Boskabady, M.H., Hosseini, M., Rezaee, R., Tsatsakis, A.M.2015. The effects of *Crocus sativus* (saffron) and its constituents on nervous system: a review. *Avicenna J. Phytomed.*, 5:376-391.
 - Kheradmand, E., Hajizadeh Moghaddam, A., Zare, M.2018. Neuroprotective effect of hesperetin and nano-hesperetin on recognition memory impairment and the elevated oxygen stress in rat model of Alzheimer's disease. *Biomed. Pharmacother.*, 97: 1096–1101.
 - Kochetova, M. V, ESemenistaya, E. N., Larionov, O .G, Revina, A. A. 2007. Determination of biologically active phenols and polyphenols in various objects by chromatographic techniques. *Russian Chemical Reviews*, 76:79-90.
 - Kordali, S., Cakir, A., Mavi, A., Kilic, H., Yildirim, A. 2005. Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* species, *J. Agric. Food Chem .*, 53: 1408-1416.
 - Kordali, S., Aslan, I., Almas, O., Cakir, A. 2006. Toxicity of essential oils isolated from three *Artemisia* species and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Industrial Crops and Products*, 23:162-170.
 - Korpe, D.A., Iseri, O.D., Sahin, F.I. et al. 2013. High-antibacterial activity of *Urtica* spp. seed extracts on food and plant pathogenic bacteria. *Int. J .Food .Sci .Nutr.*,64:355-362.
 - Kostadinovic, L.J., Levic, J., Popovic, S. et al., 2015. Dietary inclusion of *Artemisia absinthium* for management of growth performance, antioxidative status and quality of chicken meat. *Arch. Geflügelkd.* 79.
 - Kregiel, I.D., Pawlikowska, E., Antolak, H.2018. *Urtica* spp.: Ordinary Plants with Extraordinary Properties. *Dorota Molecules*, 23: 1664
 - Kulkarni, S., Akula, K.K., Deshpande, J. 2012.Evaluation of antidepressant-like activity of novel water-soluble curcumin formulations and St. John's wort in behavioral paradigms of despair. *Pharmacology*, 89:83-90.
 - Kumar, K.V., Lalitha, K.G. 2012.Indian medicinal plants. An Illustration Dictionnary. Springer. New Delhi,46-47.
 - Kumar, V., Choudhary A.K. 2016. Akarkara: a versatile medicinal plant – a review. *J. of Ayurveda and Hol Med.*, 4:1-14.
 - Kumar, V., Sami, N., Kashav, T. et al. 2016. Protein aggregation and neurodegenerative diseases: From theory to therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 124, 1105–1120.
 - Kushwaha MN, Jatav VS, Pandey S.2012. Plant *Anacyclus pyrethrum* -A Review. *Research J. Pharmacognosy Phytochemistry*, 4:164-170.
 - Kremr, D., Cocovi-Solberg, D.J., Bajerová, P. et al. 2015. On-line monitoring of in-vitro oral bioaccessibility tests as front-end to liquid chromatography for determination of chlorogenic acid isomers in dietary supplements. *Talanta*. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.082>.
- L**
- Labunskyy, V.M., Gladyshev, V.N. 2013. Role of reactive oxygen species-mediated signaling in aging. *Antioxid. Redox Signal.*, 19:1362–1372.

- Lachenmeier, D.W. 2010. Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) A curious plant with both neurotoxic and neuroprotective properties? Letter to the Editor. *Journal of Ethnopharmacology*, 131: 224–227.
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z et al. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell.*, 127:1109–1122.
- Lai, H.C., Jan, L.Y. 2006. The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat. Rev. Neurosci.*, 7: 548–562.
- Lalonde, J., Saia, G., Gill, G. 2014. Store-operated calcium entry promotes the degradation of the transcription factor Sp4 in resting neurons. *Sci. Signal.*, 7 :51.
- Lamaison, J.L.C., Carnet, A. 1990. Teneurs en Principaux Flavonoides des fleurs de *Crataegus Monogyna* Jacq et de *Crataegus Laevigata* (Poiret D. C) en Fonction de la Végétation. *Pharmaceutica Acta Helvetia*, 65: 315-320.
- Lamport, D.J., Pal, D., Moutsiana, C. et al. 2015. The effect of flavanol-rich cocoa on cerebral perfusion in healthy older adults during conscious resting state: a placebo controlled, crossover, acute trial. *Psychopharmacology*, 232: 3227-3234.
- Lati, R. N., Shem-Tov, S., Fennimore, S. A. (2016). Burning Nettle (*Urtica urens*) Germination and Seedbank Characteristics in Coastal California. *Weed Science*, 64: 664–672.
- LÊ, C. L., Julmi, C., Tschuy, F. 2007. Multiplication in vitro de l'absinthe (*Artemisia absinthium* L.). *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, 39: 263-267.
- Lebourg, E. 2001. Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett.*, 498: 183-186.
- Lee, Y.J., Thiruvengadam, M., Chung, I.M. 2013. Polyphenol composition and antioxidant activity from the vegetable plant '*Artemisia absinthium*' L. *Australian Journal of Crop Science*, 7: 1921-1926.
- Lee, E. O., Park, H. J., Kang, J. L., Kim, H. S., Chong, Y. H. 2010. Resveratrol reduces glutamate-mediated monocyte chemotactic protein-1 expression via inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in rat hippocampal slice cultures. *Journal of Neurochemistry*, 112:1477–1487.
- Lee, J., Hong, Y.J., Yang, J.S., Cho, S., Hahn, S.J., Yoon, S.H. 2013. Inhibitory Effects of Acorn Extract on Glutamate-Induced Calcium Signaling in Cultured Rat Hippocampal Neurons. *Biol. Pharm. Bul.*, 36: 331-338.
- Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M. 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125: 288-306.
- Levander, S., Minthon, L., Persson, C.M., Wallin, A.K. 2009. Changes in Cognitive Domains during three years in Patients with Alzheimers disease treated with donepezil. *Bio.Med. Central Neurology*, 9: 1-7.
- Leyte-Lugo, M., Todd, D.A., Gullledge, T.V., Juzumaite, M., Carter, F.S., Laster, S.M., Cech, N.B. 2015. Cytokine Suppressive Activity of a Hydroxylated Alkylamide from *Echinacea purpurea*. *Planta Med Lett.*, 2:125–127.
- Li, Y., Pagano, P.J. 2017. Microvascular NADPH oxidase in health and disease, *Free Radic. Biol. Med.*, 109 :33–47. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed>.
- Li, H., Qiu, N., Ding, H., Yao, R. 2008. Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. *Food Research International*, 363–370.
- Li, Y., Ohizumi, Y. 2004. Search for constituents with neurotrophic factor potentiating activity from the medicinal plants of Paraguay and Thailand. *Yakugaku Zasshi*, 124: 417-424.

- Li, Z., Pang, L., Fang, F. et al. 2012. Resveratrol attenuates brain damage in a rat model of focal ischemia via up-regulation of hippocampal Bcl-2. *Brain Research*, 1450:116–124.
- Lin, T.Y., Lu, C.W., Wang, S.J. 2016. Luteolin protects the hippocampus against neuron impairments induced by kainic acid in rats. *Neurotoxicology*, 55: 48–57.
- Liu, C., Wu, J., Xu, K. et al. 2010. Neuroprotection by baicalein in ischemic brain injury involves PTEN/AKT pathway. *J. Neurochem.*, 112 : 1500–1512.
- Liu, Y., Tian, X., Gou, L et al. 2013. Luteolin attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats, *Brain Res. Bull.*, 94: 23–29.
- Liu, F., Thompson, M.A., Wagner, S. et al.1993. Activating transcription factor 1 can mediate Ca²⁺ and cAM inducible transcriptional activation. *Biol. Chem.*, 268: 714-720.
- Liu, Y., Fu, X., Lan, N. et al 2014. Luteolin protects against high fat diet-induced cognitive deficits in obesity mice, *Behav. Brain Res.*, 267: 178–188.
- Lopes-Lutz, D., Alviano, D.S., Kolodziejczyk, P. P. 2008. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils, *Phytochem.*, 69: 1732-1738.
- Lu, J., Holmgren, A. 2014. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic. Biol. Med.*, 66 :75–87.
- Ludwig, I.A., Clifford, M.N., Lean, M. E. J. et al. 2014. Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food Funct.*, 5: 1695–1717.
- Luebke, J.I., Turner, T., Dunlap, K. 1993. Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron*, 11:895-902 .
- Lyons, M.R.; West, A.E. 2011. Mechanisms of specificity in neuronal activity-regulated gene transcription. *Prog. Neurobiol.*, 94:259-295.

M

- Maaroufi, L., Sazzad Hossain, M., Wiem Tahri, W., Landoulsi, A. 2017. New insights of Nettle (*Urtica urens*): Antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Medicinal Plants Research.*, 11: 73-86.
- Magalingam, K.B., Radhakrishnan, A., Ramdas, P., Haleagrahara, N.2015. Quercetin glycosides induced neuroprotection by changes in the gene expression in a cellular model of Parkinson's disease. *J. Mol. Neurosci.*, 55:609-617.
- Mahmoudi, M., Ebrahimzadeh, M.A., Ansaroudi, F. et al. 2009. Antidepressant and antioxidant activities of *Artemisia absinthium* L. at flowering stage. *African Journal of Biotechnology*, 8:7170-7175.
- Majlessi, N., Choopani, S., Kamalinejad, M., Azizi, Z.2012. Amelioration of amyloid induced cognitive deficits by *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil in a rat model of Alzheimer's disease. *CNS Neurosci. Ther.*,18:295-301.
- Manouze, H., Bouchatta, O., Gadhi, A.C. et al. 2017. Anti-inflammatory, Antinociceptive, and Antioxidant Activities of Methanol and Aqueous Extracts of *Anacyclus pyrethrum* Roots. *Front. Pharmacol.*, 8:1-14.
- Manu Kumar, H.M, Prathima, V.R., Thribhuvan, K.R. et al. 2013. Study of nutritional quality, phytochemicals constituents and antioxidant activities by different solvents of nettle (*Urtica urens*) from Madikeri-Karnataka state. *Int. Res. J. Pharm. App. Sci.*, 3:112-119.
- Marambaud, P., Dreses-Werringloer, U., Vingtdeux, V.2009. Calcium signaling in neurodegeneration . *Molecular Neurodegeneration*, 4:1-15.
- Marrassini, C., Acevedo, C., Miño, J. et al. 2010. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory activities and phytochemical analysis of aerial parts of *Urtica urens* L. *Phytotherapy Research.*, 24:1807-1812.

- Marengo, B., Nitti, M., Furfaro, A. L. et al. 2016. Redox Homeostasis and Cellular Antioxidant Systems: Crucial Players in Cancer Growth and Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–16.
- Mariani, E., Polidori, M. C., Cherubini, A. Mecocci, P. 2005. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *Chromatography B Analytical Technologies in Biomedical Life Sciences*, 827: 65-75.
- Marin, L.D., Sanchez-Borzone, M., Garcia, D.A. 2011. Comparative antioxidant properties of some GABAergic phenols and related compounds, determined for homogeneous and membrane systems. *Med. Chem.*, 7:317-324.
- Masondo, N.A., Stafford, G.I., Aremu, A.O. 2019 . Acetylcholinesterase inhibitors from southern African plants: An overview of ethnobotanical, pharmacological potential and phytochemical research including and beyond Alzheimer's disease treatment. *South African Journal of Botany*, 120: 39–64.
- Mattson, M.P. 2007. Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell*, 6:337-350.
- Mattson, M. P. 2000. Apoptosis in Neurodegenerative disorders. *Nature Reviews*, 1:120-129.
- Mattson, M. P. 2006. Neuronal life-and-death signaling, apoptosis, and neurodegenerative disorders. *Antioxid. Redox Signaling*, 8: 1997– 2006.
- Meinhart, A.D., Caldeirão, L., Damina, F.M. et al. 2018. Analysis of chlorogenic acids isomers and caffeic acid in 89 herbal infusions (tea). *Journal of Food Composition and Analysis*, 73: 76–82.
- Meir, S., Kanner, J., Akiri, B., filosof-hadas, S. 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 43:1813–1817.
- Melachroinou, K., Xilouri, M., Emmanouilidou, E. et al. 2013. Deregulation of calcium homeostasis mediates secreted alpha-synuclein-induced neurotoxicity. *Neurobiol Aging*, 34:2853-2865.
- Mellstrom, B., Savignac, M., Gomez-Villafuertes, R. et al. 2008. Ca²⁺-operated transcriptional networks: molecular mechanisms and in vivo models. *Physiol. Rev.*, 88:421-449.
- Melo, J.B., Sousa, C., Garçao, P. et al. 2009. Galantamine protects against oxidative stress induced by amyloid-beta peptide in cortical neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 29: 455-464.
- Mikami, Y., Yamazawa, T., 2015. Chlorogenic acid, a polyphenol in coffee, protects neurons against glutamate neurotoxicity. *Life Sci.*, 139: 69–74.
- Moghadam, F.H., Dehghan, M., Zarepur, E., et al. 2014. Oleo gum resin of *Ferula assafoetida* L. ameliorates peripheral neuropathy in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 154:183-189.
- Mohammadi, A., Mansoori, B., Baradaran, P. C. et al. 2016. *Anacyclus Pyrethrum* Extract Exerts Anticancer Activities on the Human Colorectal Cancer Cell Line (HCT) by Targeting Apoptosis, Metastasis and Cell Cycle Arrest. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 48:333–340.
- Mosharov, E.V., Larsen, K.E., Kanter, E. et al. 2009. Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and alpha-synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. *Neuron*, 62:218–229.
- Msaada, K., Hosni, K., Ben Taarit, M., Hammami, M., Marzouk, B. 2012. Effects of crop season and maturity stages on the yield and composition of essential oil of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 6:115–122.

- Msaada, K., Taarit, M.B., Hosni, et al., 2012. Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Acta Chimica Slovenica*, 59: 803–813.
- Msaada, K., Salem, N., Bachrouch, O. et al. 2015. Chemical Composition and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Essential Oils and Phenolics. J. Chem.*, 1-12.
- Mubashir, H., Naveed, I.R., Abida, A. 2017. A status review on the pharmacological implications of *Artemisia absinthium*: A critically endangered plant. *Asian Pac .J .Trop Dis.*, 7: 185-192.
- Muller-Jakic, B., Breu, W., Probstle, A. et al. 1994. In-vitro inhibition of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase by alkaloids from *Echinacea* and *Achillea* species. *Planta Med.*, 60: 37–40.
- Muthiah, P.L., Umamaheswari, M., Asokkumar, K. 2012. In vitro antioxidant activities of leaves, fruits and peel extracts of citrus. *International Journal of Phytopharmacy*, 2:13-20.
- Mzid, M., Ben Khedir, S., Ben Salem, M et al. 2017. Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol and aqueous extracts from *Urtica urens*. *Pharmaceutical biology*, 55: 775–781.
- Mzid, M., Ben Khedir, S., Bardaa, S. et al. 2016. Chemical composition, phytochemical constituents, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Urtica urens* L. leaves. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 123: 93–104.

N

- Nalbantsoy, A., Erel, S.B., Köksal, C., Göcmen, B., Yıldız, M.Z., Karabay Yavasoglu N.U. 2013. Viper venom induced inflammation with *Montivipera xanthina* (Gray, 1849) and the anti-snake venom activities of *Artemisia absinthium* L. in rat. *Toxicol.*, 65: 34-40.
- Nasica-Labouze, J., Nguyen, P.H., Sterpone, F., Berthoumieu, O et al. 2015. Amyloid β protein and Alzheimer's disease: when computer simulations complement experimental studies, *Chem. Rev.*, 115: 3518–3563.
- Nathan-Maister, D. 2008. *The Absinthe Encyclopedia*. Oxygénée Press, Burgess Hill, UK.
- Nemmiche, S. 2017. Oxidative Signaling Response to Cadmium Exposure. *Toxicological sciences*, 156:4–10.
- Nencu, I., Vlase, L., Istudor, V., , Mircea, T. 2015. Preliminary research regarding *URTICA* L. and *URTICA* Dioica. *Farmacia*, 63: 5.
- Nezhadali, A., Parsa, M. 2010. Study of the volatile compounds in *Artemisia absinthium* from Iran using HS/SPME/GC/MS. *Advances in Applied Science Research*, 1: 174-179.
- Ng, Y. P., Or, T. C. T., Ip, N. Y. 2015. Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 89: 260–270.
- Nieoullon, A. 2011. Neurodegenerative diseases and neuroprotection: current views and prospects. *J. Appl. Biomed.*, 9: 173-183.
- Nkondjock, A. 2009. Coffee consumption and the risk of cancer: An overview. *Cancer Letters*, 277:121–125.

O

- OCDE. 2008. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guidelines for acute toxicity of chemicals. No. 425.
- OECD. 2001. Test Guideline 425. Acute Oral Toxicity. Statistical Programme (AOT 425 StatPgm). Version: 1.0, <http://www.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/>.
- OECD/OCDE. 2002. Guidelines for the testing of chemicals, revised draft guidelines 423; acute oral toxicity-acute toxic class method, OECD publishing.
- Okello, E. J., Leylabi, R., McDougall, J. 2012. Inhibition of acetylcholinesterase by green and white tea and their simulated intestinal metabolites. *Food and Function*, 3: 651– 661.

- Oktay, M., Gülçin, I., Küfrevioğlu, Ö.I. 2003. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensmittel-Wissenschaft Technol.*, 36:263-271.
- Olah, Z., Redei, D., Pecze, L. 2017. Pellitorine, an extract of *Tetradium daniellii*, is an antagonist of the ion channel TRPV1, *Phytomedicine*, 34: 44–49.
- Olney, J. W., de-Gubareff, T. 1978. *Nature*, 271: 557-559.
- Ono, K., Yoshiike, Y., Takashima, A. et al. 2003. Potent anti-amyloidogenic and fibrildestabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 87:172-181.
- Orhan, I. E., Belhattab, R., Şenol, F. S. et al. 2010. Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species. *Industrial Crops and Products*, 32: 566–571.
- Ottolini, D., Cali, T., Negro, A., Brini, M. 2013. The Parkinson disease-related protein DJ-1 counteracts mitochondrial impairment induced by the tumour suppressor protein p53 by enhancing endoplasmic reticulum–mitochondria tethering. *Hum. Mol. Genet.*, 22:2152–2168.
- Ouarghidi, A., Powell, B., Martin, G. J., Abbad, A. 2017. Traditional Sustainable Harvesting Knowledge and Distribution of a Vulnerable Wild Medicinal Root (*A. pyrethrum* var. *pyrethrum*) in Ait M'hamed Valley, Morocco. *Economic Botany*, 71 : 83–95.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn. J. Nutr.*, 44: 307-315.
- Oyama, Y., Carpenter, D. O., Chikahisa, L., Okazaki, E., 1996. *Brain Res.*, 728: 121-124.
- Özgen, U., Mavi, A., Terzi, Z., Coflkun, M., et al., 2004. Antioxydants activities and total phenolic compounds amount of some Asteraceae spices. *Turkish J. Pharm. Sci.* 1: 203-216.
- Özyürek, M., Bektasoglu, B., Guçlu, K., Apak, R. 2008. Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation. *Analytica Chimica Acta*, 616: 196-206.

P

- Padosch, S.A., Lachenmeier, D.W., Kröner, L.U., 2006. Absinthism: a fictitious 19th century syndrome with present impact. *Substance Abuse Treatment, Prevention, and Policy* 1, 14.
- Pahuja, M., Mehla, J., Reeta, K.H. et al. 2012. Root extract of *Anacyclus pyrethrum* ameliorates seizures, seizure-induced oxidative stress and cognitive impairment in experimental animals. *Epilepsy Res.*, 98:157-165.
- Paillart, C., Carlier, E., Guedin, D., Dargent, B., Couraud, F. 1997. Direct block of voltage-sensitive sodium channels by genistein, a tyrosine kinase inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 280: 521–526.
- Pak, M.E., Kim, Y.R., Kim, H.N et al. 2016. Studies on medicinal herbs for cognitive enhancement based on the text mining of Dongeuibogam and preliminary evaluation of its effects. *J. Ethnopharmacol.*, 179: 383–390.
- Palty, R., Silverman, W.F., Hershfinkel, M. et al. 2010. NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107:436–441.
- Pandey, A. K., Hazari, P.P., Patnaik, R. et al. 2011. The role of ASIC1a in neuroprotection elicited by quercetin in focal cerebral ischemia. *Brain Research*, 1383: 289–299.

- Panza, F., Solfrizzi, V., Barulli, M. R. et al. 2015. Coffee, tea, and caffeine consumption and prevention of late-life cognitive decline and dementia: A systematic review. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 19:313–328.
- Parekh, H.S., Liu, G., Wei, M.Q. 2009. A new dawn for the use of traditional Chinese medicine in cancer therapy. *Mol. Cancer.*, 8:1-8.
- Patel, J.S., Galani, V.J., Prajapati, C.G. 2011. Review on learning and memory; *Inventi Rapid. Molecular Pharmacol.*, 2: 1-8.
- Pattewar, R.G., Katedeshmukh, Vyawahare, N.S., Kagathar, V.G. 2011. Phytomedicine and cognition. *International Journal Pharmacy and Science Research*, 2: 778-791.
- Patočka, J., Plucar. O. 2003. Pharmacology and toxicology of absinthe. *Journal of Applied Biomedicine*, 1: 199–205.
- Peng, B.J., Zhu, Q., Zhong, Y.L. et al. 2015. Chlorogenic Acid Maintains Glucose Homeostasis through Modulating the Expression of SGLT-1, GLUT-2, and PLG in Different Intestinal Segments of Sprague-Dawley Rats Fed a High-Fat Diet. *Biomed. Environ. Sci.*, 28: 894–903.
- Perry, E., Howes, M.J. R. 2010. Medicinal Plants and Dementia Therapy: Herbal Hopes for Brain Aging? *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 17: 683–698.
- Philipson, K.D., Nicoll, D.A., Ottolia, M. et al. 2002. The Na⁺/Ca²⁺ exchange molecule: an overview. *Ann N Y. Acad. Sci.*, 976:1-10.
- Picón-Pagès, P., Garcia-Buendia, J., Muñoz, F. J. 2018. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 1-19.
- Pieczenik, S. R., Neustadt, J. 2007. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Experimental and Molecular Pathology*, 83: 84-92.
- Pietta, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63:1035-1042.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., Núñez, M.J. 2005. Effect of solvent temperature, and solvent to solid ratio on the total phenolic content and anti-radical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2111–2117.
- Pinto-Scognamiglio, W. 1967. Current knowledge on the pharmacodynamic activity of the prolonged administration of thujone, a natural flavoring agent. *Boll. Chimico Farmaceutico*, 106: 292–300.
- Popović, S.J., Kostadinović, L.M., Puvača, N. M. et al. 2017. Potential of wormwood (*Artemisia absinthium*) as a feed supplement in rabbit diet: effect on controlling rabbit coccidiosis, antioxidative systems and growth performance. *Veterinarski Arhiv.*, 87: 769-782.
- Prajapati, N.D., Purohit, S.S., Sharma, A.K., Kumar, T., 2003. *A Handbook of Medicinal Plants: A Complete Source Book*. Agrobios, India, 43-44.
- Priya, P., Arul Anandraj, C.A. Parbati, K. 2014. Study of anti-pyretic activity of ethanolic extract in *Anacyclus pyrethrum* DC. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*, 4:312-316.
- Puri, H.S. 2003. *Rasayana - Ayurvedic herbs for longevity and rejuvenation*. CRC Press, Taylor & Francis Group, London, 368.

Q

- Qi, Y., Wang, J.K.T., McMillian, M., Chikaraishi, D. M. 1997. Characterization of a CNS Cell Line, CAD, in which Morphological Differentiation Is Initiated by Serum Deprivation. *The Journal of Neuroscience*, 17:1217–1225.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységou, L. 2011. *Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis*. *Angewandte Chemie International Edition*, 50: 586–621.

- Qingming, Y., Xianhui, P., Weibao, K. et al. 2010. Antioxidant activities of malt extract from barley (*Hordeum vulgare* L.) toward various oxidative stress in vitro and in vivo. *Food Chem.*, 118:84-89.

R

- Rabassa, M., Cherubini, A., Zamora-Ros, R et al. 2015. Low levels of a urinary biomarker of dietary polyphenol are associated with substantial cognitive decline over a 3-year period in older adults: the invecchiare in chianti study. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 63:938-946.
- Rabiei, Z. 2017. Anticonvulsant effects of medicinal plants with emphasis on mechanisms of action. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 7: 166–172.
- Rad, J. S., Shahraki, S., Rostami, F. M., Shahraki, M. R., Arab, M. R. 2014. Effects of Aqueous Root Extracts of *Anacyclus pyrethrum* on Gonadotropins and Testosterone Serum in Adult Male Rats. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2: 767-772.
- Raffaello, A., De Stefani, D., Sabbadin, D. et al. 2013. The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can include a dominant-negative pore-forming subunit. *EMBO J.*, 32:2362–2376.
- Rahigude, A., Bhutada, P., Kaulaskar, S et al. 2012. Participation of antioxidant and cholinergic system in protective effect of naringenin against type-2 diabetes-induced memory dysfunction in rats. *Neuroscience* 226: 62–72.
- Ramezani, M., Darbandi, N., Khodaghali, F., Hashemi, A. 2016. Myricetin protects hippocampal CA3 pyramidal neurons and improves learning and memory impairments in rats with Alzheimer's disease. *Neural Regen. Res.*, 11: 1976–1980.
- Reichmann, D., Voth, W., Jakob, U. 2018. Maintaining a Healthy Proteome during Oxidative Stress. *Molecular Cell.*, 69:1-11.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. 1996. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.*, 20:933–956.
- Rice-Evans, C. A. Miller, N. J. 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food, *Biochemical Society Transactions*, 24: 790-795.
- Rimbau, V., Risco, E., Canigueral, S. et al. 1996. Antiinflammatory activity of some extracts from plants used in the traditional medicine of North African countries. *Phytother Res.*, 10: 421–423.
- Rios, M.Y. 2012. Natural Alkaloids: Pharmacology, Chemistry and Distribution. *Drug Discovery Research in Pharmacognosy*, 107-144.
- Roberts Margaret, F., Wink, M. 1998. *Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Application*. Plenum Press.
- Rodrigo, R., Miranda, A., Vergara, L. 2011. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta.*, 412:410-424.
- Rodriguez-Mateos, A., Rendeiro, C., Bergillos-Meca, T. et al. 2013. Intake and time dependence of blueberry flavonoid-induced improvements in vascular function: a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study with mechanistic insights into biological activity. *Am. J. Clin. Nutr.* 98: 1179–1191.
- Rodriguez-Mateos, A., Vauzour, D., Christian, G. 2014. Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Arch. Toxicol.*, 88:1803–1853.
- Rogawski, M. A., Donovan, S. D. 1999. *Arch. Neurol.* 79: 947-963.
- Romojaro, A., Botella, M. Á., Obón, C., Pretel, M. T. 2013. Nutritional and antioxidant properties of wild edible plants and their use as potential ingredients in the modern diet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64: 944–952.

- Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, A.V. et al. 2005. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function, *J. Cell Biol.*, 169:435–445.

S

- Sa, F., Zhang, L.Q., Chong, C.M. 2015. Discovery of novel anti-parkinsonian effect of schisantherin A in in vitro and in vivo. *Neurosci. Lett.*, 593: 7–12.
- Saeed, F., Ahmad, M. 2016. Chronic toxicity studies: Effects of *Urtica urens* Linn. on hematological, biochemical and histo-pathological parameters in albino rabbits. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 11: 108-117.
- Salah, S.M., Jäger, A.K., 2004. Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *J. Ethnopharmacol.*, 97: 145–149.
- Saleem, S., Ahmad, M., Ahmad, A.S., et al. 2006. Effect of Saffron (*Crocus sativus*) on neurobehavioral and neurochemical changes in cerebral ischemia in rats. *J. Med. Food.*, 9:246-253.
- Sargin, S.A., Akçicek, E., Selvi, S. 2013. An ethnobotanical study of medicinal plants used by the local people of Alaşehir (Manisa) in Turkey. *Journal of ethnopharmacology* 150: 860-874.
- Sawamura, S., Shirakawa, H., Nakagawa, T. et al. 2017. Y. TRP channels in the brain: what are they there for? in: T.L.R. Emir (Ed.), *Neurobiology of TRP Channels*, CRC Press, Boca Raton, 295–322.
- Schmitt-schillig, S., Schaffer, S., Weber, C.C., Eckert, G.P., Muller, W.E. 2005. Flavonoids and the aging brain. *Journal of physiology and pharmacology*, 56: 23–36.
- Schroeter, H., Heiss, C., Spencer, J.P., Keen, C.L., Lupton, J.R., Schmitz, H.H., 2010. Recommending flavanols and procyanidins for cardiovascular health: current knowledge and future needs. *Mol. Aspects Med.*, 31, 546–557.
- Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J. et al. 2006. (–)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103: 1024–1029.
- Scott, L.J., Goa, K.L. 2000. Galantamine: a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs*, 60: 1095-1122.
- Selfridge, J.E., Lu, L. E. J., Swerdlow, R.H. 2013. Role of mitochondrial homeostasis and dynamics in Alzheimer's disease, *Neurobiol. Dis.*, 51: 3–12.
- Selles, C. 2012. Valorisation d'une plante médicinale a activité antidiabétique de la région de Tlemcen : *Anacyclus pyrethrum* L. Application d'extrait aqueux a inhibition de corrosion d'un acier doux dans H₂SO₄ 0.5M, Université Abou Bekr Belkaid. Algérie, 175.
- Selles, C., El Amine, D. M., Allali, H., Tabti, B. 2012. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of solvent extracts of *Anacyclus pyrethrum* L., from Algeria. *Mediterr. J. Chem.*, 2: 408-415.
- Selles, C., Dib, Mel, A., Djabou, N. et al. 2013. Antimicrobial activity and evolution of the composition of essential oil from Algerian *Anacyclus pyrethrum* L. through the vegetative cycle. *Nat. Prod. Res.*, 27:2231– 2234.
- Sengul, M., Ercisli, S., Yildiz, H. et al. 2011. Antioxidant, antimicrobial activity and total phenolic content within the aerial parts of *artemisia absinthum*, *Artemisia santonicum* and *Saponaria officinalis*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10: 49-56.
- Seomun, Y., Jong-Tak, K., Ki-Yong, K. 2005. Induction of p21Cip1-mediated G2 /M arrest in H₂ O₂ -treated lens epithelial Cells. *Molecular Vision*, 11:764-774 .
- Shahraki, S., Rad, J.S., Rostami, F.M. et al. 2014. Effects of Aqueous Root Extracts of *Anacyclus pyrethrum* on Gonadotropins and Testosterone Serum in Adult Male Rats. *American J. Phytomed. Clinical Therapeutics*, 2: 767-772.

- Shan, J., Fu, J., Zhao, Z. et al. 2009. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF- κ B and JNK/AP-1 activation. *International Immunopharmacology*, 9:1042–1048.
- Sharma, V., Boonen, J., Spiegeleer, B.D., Dixit, V.K. 2013. Androgenic and spermatogenic activity of alkylamide-rich ethanol solution extract of *Anacyclus pyrethrum* DC. *Phytotherapeutic Research*, 27: 99- 106.
- Shati, A., Elsaied, F., Hafez, E. 2011. Biochemical and molecular aspects of aluminium chloride-induced neurotoxicity in mice and the protective role of *Crocus sativus* L. extraction and honey syrup. *Neuroscience*, 175:66-74.
- Sheikh, S., Haque, E., Irfan, S., Mir, S.S. 2013. Neurodegenerative Diseases: Multifactorial Conformational Diseases and Their Therapeutic Interventions. *Journal of Neurodegenerative Diseases*, 1-8.
- Shibata, N., Kobayashi, M. 2008. The role for oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Brain Nerve*, 60: 157-170.
- Shin, H.S., Satsu, H., Bae, M.J. et al. 2015. Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. *Food Chem.*, 168, 167–175.
- Shin, D.H., Seo, E.Y., Pang, B. et al. 2011. Inhibition of Ca²⁺-release activated Ca²⁺-channel (CRAC) and K⁺ channels by curcumin in Jurkat-T cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 115: 144–154.
- Shrivastava, S.K., Sinha, S.K., Srivastava, P. et al. 2019. Design and development of novel p-aminobenzoic acid derivatives as potential cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg. Chem.*, 82 : 211–223.
- Singh, R., Verma, K.P., Singh, G. 2012. Total phenolic, flavonoids and tannin contents in different extracts of *Artemisia absinthium* J *Intercult Ethnopharmacol*, 1:101-104.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16: 144-158.
- Sivandzade, F., Prasad, S., Bhalerao, A., Cucullo, L. 2019. NRF2 and NF- κ B interplay in cerebrovascular and neurodegenerative disorders: Molecular mechanisms and possible therapeutic approaches. *Redox Biology*, 21: 101-059.
- Siveen, K.S., Kuttan, G. 2011. Augmentation of humoral and cell mediated immune responses by Thujone. *Int. Immunopharmacol.*, 11: 1967-1975.
- Slemmer, J.E., Weber, J.T. 2014. Assessing Antioxidant Capacity in Brain Tissue: Methodologies and Limitations in Neuroprotective Strategies. *Antioxidants*, 3:636-648.
- Smith, K.J., Kapoor, R., Felts, P.A. 1999. Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol.*, 9: 69–92.
- Smith, J.F., Pillai, A., Chen, K., Horwitz, B. 2010. Identification and validation of effective connectivity networks in functional magnetic resonance imaging using switching linear dynamic systems. *Neuroimage*, 52:1027-1040.
- Sohal, R. S. 2002. Oxidative stress hypothesis of aging. *Free Radic. Biol. Med.*, 33: 573-574.
- Solfrizzi, V., Scafato, E., Capurso, C et al. 2011. Metabolic syndrome, mild cognitive impairment, and progression to dementia: the Italian longitudinal study on aging. *Neurobiol. Aging*, 32: 1932-1941.
- Song, F., Zeng, K., Liao, L. et al. 2016. Schizandrin A inhibits microgliamediated neuroninflammation through inhibiting TRAF6-NF- κ B and Jak2-Stat3 signaling pathways. *PLoS One*, 11:1-16.

- Sowndhararajan, K., Deepa, P., Kim, M., Park, S.J., Kim, S. 2018. An overview of neuroprotective and cognitive enhancement properties of lignans from *Schisandra chinensis*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97:958–968.
 - Spichiger, R.E., Figeat, M., Savolainen, V., Perret, M. 2002. *Botanique systématique des plantes à fleurs*. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. France.
 - Stangl, D., Thuret, S., 2009. Impact of diet on adult hippocampal neurogenesis. *Genes Nutr.*, 4: 271–282.
 - Stocker, R., Keaney Jr, J.F. 2004. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.*, 84:1381-1478.
 - Strehler, E.E., Caride, A.J., Filoteo, A.G. et al. 2007. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1-10.
 - Subasri, G., John, A.S. 2016. Screening of phytochemical compounds, trace metals and antimicrobial activity of *Anacyclus pyrethrum*. *Int. J. Adv. Scienti. Res.*, 2: 32-37.
 - Sueishi, Y., Ishikawa, M., Yoshioka, D. et al. 2012. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of cyclodextrin-solubilized flavonoids, resveratrol and astaxanthin as measured with ORACEPR method. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 50: 127–132.
 - Sujith, K., Ronald Darwin, C., Suba, V. 2011. Antioxidant Activity of Ethanolic Root Extract of *Anacyclus pyrethrum*. *International Research Journal of Pharmacy*, 2:222-226.
 - Sujith, K., Darwin, C.R., Suba, V. 2012. Memory-enhancing activity of *Anacyclus pyrethrum* in albino Wistar rats. *Asian pacific journal of tropical disease*, 2: 307-311.
 - Sujith, K., Darwin, C.R., Suba, V. 2012. Toxicological evaluation of ethanolic extract of *Anacyclus pyrethrum* in albino wistar rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2: 437-441.
 - Sukumaran, K., Kuttan, R. 1995. Inhibition of tobacco-induced mutagenesis by eugenol and plant-extracts. *Mutat. Res. Genetic. Toxicol.*, 343: 25– 30.
 - Summanen, J., Vuorela, P., Rauha, J.P. et al. 2001. Effects of simple aromatic compounds and flavonoids on Ca^{2+} fluxes in rat pituitary GH4C1 cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 414: 125-133.
 - Suri, C., Fung, B.P., Tischler, A.S., Chikaraishi, D.M. 1993. Catecholaminergic cell lines from the brain and adrenal glands of tyrosine hydroxylase SV40 T antigenic mice. *J Neurosci.*, 13:1280 -1291.
 - Suzuki, M., Tabuchi, M., Ikeda, M et al . 2004. Protective effects of green tea catechins on cerebral ischemic damage. *Med .Sci .Monit.*, 10: 166-174.
 - Sweeney, P., Park, H., Baumann, M. et al. 2017. Protein misfolding in neurodegenerative diseases : implications and strategies. *Translational Neurodegeneration*, 6: 1-13.
 - Sylvestre, M., Legault, J., Dufour, D., Pichette A. 2005. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L.. *Phytomedicine*, 12: 299-304.
 - Szabadics, J., Erdelyi, L. 2000. Pre- and Postsynaptic Effect of Eugenol and Related Compounds on *Helix pomatia* L. Neurons. *Acta Biologica Hungarica*, 51:265-273.
 - Szabo, M., Idițoiu, C., Chambre, D., Lupea, A. 2007. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. *Chemical Papers*, 61:214-216.
- T**
- Takeshima, H., Venturi, E., Sitsapesan, R. 2015. New and notable ion-channels in the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum: do they support the process of intracellular Ca^{2+} release? *J. Physiol.*, 593: 3241–3251.
 - Tamaddonfard, E., Farshid, A.A., Ahmadian, E., Hamidhoseyni, A. 2013. Crocin enhanced functional recovery after sciatic nerve crush injury in rats. *Iran J. Basic .Med .Sci.*, 16:83-90.

- Tauheed, A., Hamiduddin, Ali, A.2017. Aqarqarha (*Anacyclus pyrethrum*) a potent drug in unani medicine: a review on its historical and phyto-pharmacological perspective. *J. Pharm. Sci. Innov.*, 6:22-28.
- Taylor, C.W., Tovey, S.C. 2010. IP(3) receptors: toward understanding their activation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2:a004010.
- Thompson, J.L., Mignen, O., Shuttleworth, T.J .2013. The ARC channels an endogenous store-independent Orai channel. *Curr. Top. Membr.*, 71:125–148.
- Tillman, T.S, Cascio, M.2003. Effects of membrane lipids on ion channel structure and function. *Cell Biochem. Biophys.*, 38, 161–190.
- Toda, N., Ayajiki, K., Okamura, T., 2009. Cerebral blood flow regulation by nitricoxide in neurological disorders. *Cana. J. Physiol. Pharmacol.*, 87: 581–594.
- Tsvetkova, D., Obreshkova, D., Zheleva-Dimitrova, D. et al. 2013. Antioxidant activity of galantamine and some of its derivatives. *Curr. Med. Chem.*, 20: 4595-4608.
- Tyagi, S., Ashim, M.M, Narendra, K.S., Manoj, K.S., Bhardwaj, P., Singh, R.K. 2011. Antidiabetic Effect of *Anacyclus pyrethrum* DC in Alloxan Induced Diabetic Rats. *European Journal of Biological Sciences*, 3: 117-120.

U

- UICN. 2017. <http://www.iucnredlist.org/>.
- Usmani, A., Khushtar, M., Arif, M., Siddiqui, M.A., Prakash S.P., Mujahid,M. 2016. Pharmacognostic and phytopharmacology study of *Anacyclus pyrethrum*: An insight. *J .App. Pharm. Sci.*, 6: 144-150.

V

- Valko, M., Rhodes,C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M.2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160:1-40.
- Van Dam, E.A., vander Harst, J.E., ter Braak, C.J et al.2013. An automated system for the recognition of various specific rat behaviours. *J. Neurosci. Methods*, 218:214-224.
- Van Hecken, L. 2004. Literature review on *Anacyclus pyrethrum* and profile of company jura in Germany who supplies the pyrethrum root powder. <http://users.skynet.be/bertram.zambiafoundation>.
- Van houten, B., Woshner, V., Santos, J.H.2006. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA repair*,5: 145-152.
- Vauzour, D., Vafeiadou, K., Spencer, J. P.E.2007. Inhibition of the formation of the neurotoxin 5-S-cysteinyl-dopamine by polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362: 340–346.
- Vauzour, D., Vafeiadou, K., Rodriguez-Mateos, A. et al. 2008. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes & Nutrition*, 3: 115–126.
- Vauzour, D. 2012. Dietary polyphenols as modulators of brain functions: Biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxid. Med. Cell. Longev.*,1-16.
- Vauzour, D. et al. 2017. Nutrition for the ageing brain: Towards evidence for an optimal diet .*Ageing Research Reviews*, 35: 222–240.
- Ververidis, F., Trantas, E., Douglas, C et al. 2007. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: chemical diversity, impacts on plant biology and human health, *Biotechnol. J.*, 2:1214–1234.
- Veryser, L., Wynendaele, E., Lien Taevernier, L et al. 2014. N-alkylamides: from plant to brain .*Functional Foods in Health and Disease*,4: 264-275.

- Veryser, L., Tavevner, L., Joshi, T. et al. 2016. Mucosal and blood-brain barrier transport kinetics of the plant N-alkylamide spilanthol using in vitro and in vivo models. *BMC Complement. Altern. Med.*, 16: 177.
- Verzelloni, E., Pellacani, C., Tagliazucchi, D. et al. 2011. Antiglycative and neuroprotective activity of colon-derived polyphenol catabolites. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55: S35–S43.

W

- Wake, G., Court, J., Pickering, A., Lewis, R., Wilkins, R., Perry, E. 2000. CNS acetylcholine receptor activity in European medicinal plants traditionally used to improve failing memory. *J. Ethnopharmacol*, 69: 105–114.
- Wallace, C.H., Baczkó, I., Jones, L., Fercho, M., Light, P.E. 2006. Inhibition of cardiac voltage-gated sodium channels by grape polyphenols. *Br. J. Pharmacol.*, 149:657-665.
- Wang, Q. 2001. Present-Day Crustal Deformation in China Constrained by Global Positioning System Measurements. *Science*, 294: 574–577.
- Wang, J., Maldonado, M. A. 2006. The Ubiquitin-Proteasome System and Its Role in Inflammatory and Autoimmune Diseases, *Cell. Mol. Immunol.*, 3: 255-261.
- Wang, J., Du, X.X, Jiang, H. 2009. Curcumin attenuates 6-hydroxydopamine induced cytotoxicity by anti-oxidation and nuclear factor-kappaB modulation in MES cells. *Biochem. Pharmacol.*, 78:178-183.
- Wang, J.H, Cheng, J., Li, C.R., Ye, M., Ma, Z., Cai, F. 2011. Modulation of Ca²⁺ signals by epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in cultured rat hippocampal neurons. *Int. J. Mol. Sci.*, 12 : 742-754.
- Watson, J.B., Khorasani, H., Persson, A. et al. 2002. Age-related deficits in longterm potentiation are insensitive to hydrogen peroxide: coincidence with enhanced autophosphorylation of Ca²⁺/calmodulin -dependent protein kinase II. *J. Neurosci. Res.*, 70: 298–308.
- Wayman, G.A., Lee, Y.S., Tokumitsu, H. et al. 2008. Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron*, 59:914-931.
- Wegierski, T., Jacek, K. 2018. Neuronal calcium signaling via store-operated channels in health and disease. *Cell Calcium*, 74:102–111.
- Whaley-Connell, A., McCullough, P.A., Sowers, J.R. 2011. The role of oxidative stress in the metabolic syndrome. *Rev. Cardiovasc. Med.*, 12: 21-29.
- Wichtl, M., Anton, R. 2003. *Plantes thérapeutiques: Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*. TEC & DOC Lavoisier.
- Williamson, R., McNeilly, A., Sutherland, C., 2012. Insulin resistance in the brain: an old-age or new-age problem? *Biochem. Pharmacol.*, 84: 737-745.
- Winterbourn, C.C., Kettle, A.J., Hampton, M.B. 2016. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu. Rev. Biochem.*, 85: 765–792.
- Woelkart, K., Frye, R.F., Derendorf, H. et al. 2009. Pharmacokinetics and tissue distribution of dodeca-2E,4E,8E,10E/Z-tetraenoic acid isobutylamides after oral administration in rats. *Planta Med.*, 75:1306-1313.
- Wojda, U., Salinska, E., Kuznicki, J. 2008. Calcium Ions in Neuronal Degeneration. *IUBMB Life*, 60: 575–590.
- Wu, Y., Whiteus, C., Xu, C.S. et al. 2017. Contacts between the endoplasmic reticulum

- Wu, J. M., Hsieh, T. C. 2011. Resveratrol: a cardioprotective substance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1215:16–21.
- Wynendaele, E., De Spiegeleer, B., Gevaert, B. et al. 2018. Regulatory status of N-alkylamide containing health products. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 98:215–223.

X

- Xican, Li., Ke, Li., Hong, Xie. et al. 2018. Antioxidant and Cytoprotective Effects of the Di-O-Caffeoylquinic Acid Family: The Mechanism, Structure–Activity Relationship, and Conformational Effect. *Molecules*, 23: 222.
- Xi-Qiao, Z., Xiao, N.Z., Hui, K., Xiu, L.S., 2008. Neuroprotective effects of berberine on stroke models in vitro and in vivo. *Neuroscience Letters*, 447 : 31–36.
- Xu, X., Kanbara, K., Azakami, H., Kato, A. 2004. Expression and Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Cne1p, a Calnexin Homologue. *Journal of Biochemistry*, 135: 615–618.

Y

- Yamada, J. Hatabe, K. Tankyo, S. 2016. Cell type- and region-specific enhancement of adult hippocampal neurogenesis by daidzein in middle-aged female mice. *Neuropharmacology* 111: 92–106.
- Yang, J., Song, S., Li, J., Liang, T. 2014. Neuroprotective effect of curcumin on hippocampal injury in 6-OHDA-induced Parkinson's disease rat. *Pathol. Res. Pract.*, 210:357-362.
- Yao, Y., Han, D. D., Zhang, T., Yang, Z. 2010. Quercetin improves cognitive deficits in rats with chronic cerebral ischemia and inhibits voltage-dependent sodium channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Phytotherapy Research*, 24:136–140.
- Yarnell, E.L., Abascal, K. 2013. *Artemisia absinthium* (Wormwood). In: Pizzorno JE, Murray MT, editors. *Textbook of Natural Medicine* 4th ed. USA: Elsevier Press, 591-593.
- Ye, Z.W., Zhang, J., Townsend, D. M., Tew, K. D. 2015. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850:1607–1621.
- Yin, W. Q., Duan, S. Q., Zhang, Y et al. 2010. Antioxidant activities of different solvents extracts and alkaloids of *Uncaria rhyrachophylla* (Miq.) Jacks,” *Journal of Guangxi Normal University*, 28:31–34.
- Yu, T.X., Zhang, P., Guan, Y. et al. 2015. Protective effects of luteolin against cognitive impairment induced by infusion of Aβ peptide in rats. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 8: 6740–6747.
- Youdim, K.A., Joseph, J.A. 2001. A possible emerging role of phyto-chemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. *Free Radical Biology and Medicine*, 30: 583-594.
- Youdim, K.A., Qaiser, M.Z., Begley, D.J. 2004. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radic. Biol. Med.*, 36:592-604.
- Yow, T.T., Pera, E., Absalom, N. et al. 2011. Naringin directly activates inwardly rectifying potassium channels at an overlapping binding site to tertiapin-Q. *British Journal of Pharmacology*, 163:1017–1033.

Z

- Zaidi, S., Shadab, A.P., Surender, S. et al. 2013. Anticonvulsant, Anxiolytic and Neurotoxicity Profile of Aqarqarha (*Anacyclus pyrethrum*) DC. (Compositae) Root Ethanolic Extract. *Pharmacology & Pharmacy*, 4: 535-541.
- Zarchin, N., Meilin, S., Rifkind, J., Mayevsky, A. 2002. Effect of aging on brain energy metabolism. *Comp.Biochem.Physio.*, 132:117-120.
- Zarmouh, N.O., Messeha, S.S., Elshami, F.M., Soliman, K.F.2016. Natural products screening for the identification of selective monoamine oxidase-B inhibitors. *Eur. J. Med. Plants*,15: 1-23.
- Zawada, W.M., Mrak, R.E., Biedermann, J et al 2015. Loss of angiotensin II receptor expression in dopamine neurons in Parkinson's disease correlates with pathological progression and is accompanied by increases in Nox4- and 8-OH guanosine-related nucleic acid oxidation and caspase-3 activation. *Acta Neuropathol. Commun.*, 3: 9.
- Zeng, K.W., Liao, L.X., Song, X.M., et al .2015. Caruifolin D from *Artemisia absinthium* L. inhibits neuroinflammation via reactive oxygen species-dependent c-jun N-terminal kinase and protein kinase c/NF- κ B signaling pathways. *Eur .J. Pharmacol.*, 767:82–93.
- Zhang, X., Hu, J., Zhong, L. et al. 2016. Quercetin stabilizes apolipoprotein E and reduces brain A β levels in amyloid model mice. *Neuropharmacology*,108:179-192.
- Zhao, Y., Zhao, B. 2013. Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 316-523.
- Zheng, G.Q.1994.Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. *Planta Med.*, 60:54–57.
- Zheng, Z.Y., Sheng, Y.C., Lu, B., Ji, L.L., 2015. The therapeutic detoxification of chlorogenic acid against acetaminophen-induced liver injury by ameliorating hepatic inflammation. *Chem. Biol. Interact.*, 238: 93–101.
- Zhou, D., Shao, L., Spitz, D.R. 2014. Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells, *Adv. Cancer Res.*, 122: 1–67.
- Zucker, R.S. 1999. Calcium and activity dependent synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 9:305–313.
- Zündorf, G., Reiser, G. 2011. Calcium Dysregulation and Homeostasis of Neural Calcium in the Molecular Mechanisms of Neurodegenerative Diseases Provide Multiple Targets for Neuroprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14: 1275-1288.

A vertical grey bar is positioned on the left side of the page, extending from the top to the bottom. A thin black horizontal line crosses the page near the top, intersecting the vertical bar.

Annexe

ANNEXE

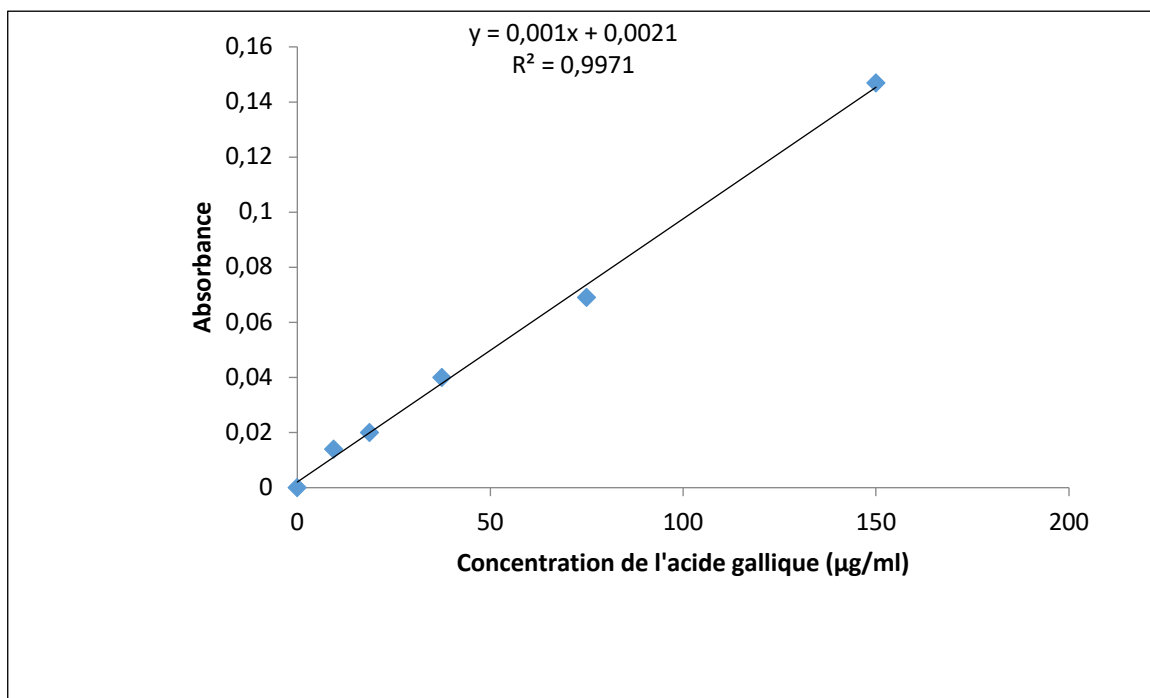


Figure 35. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

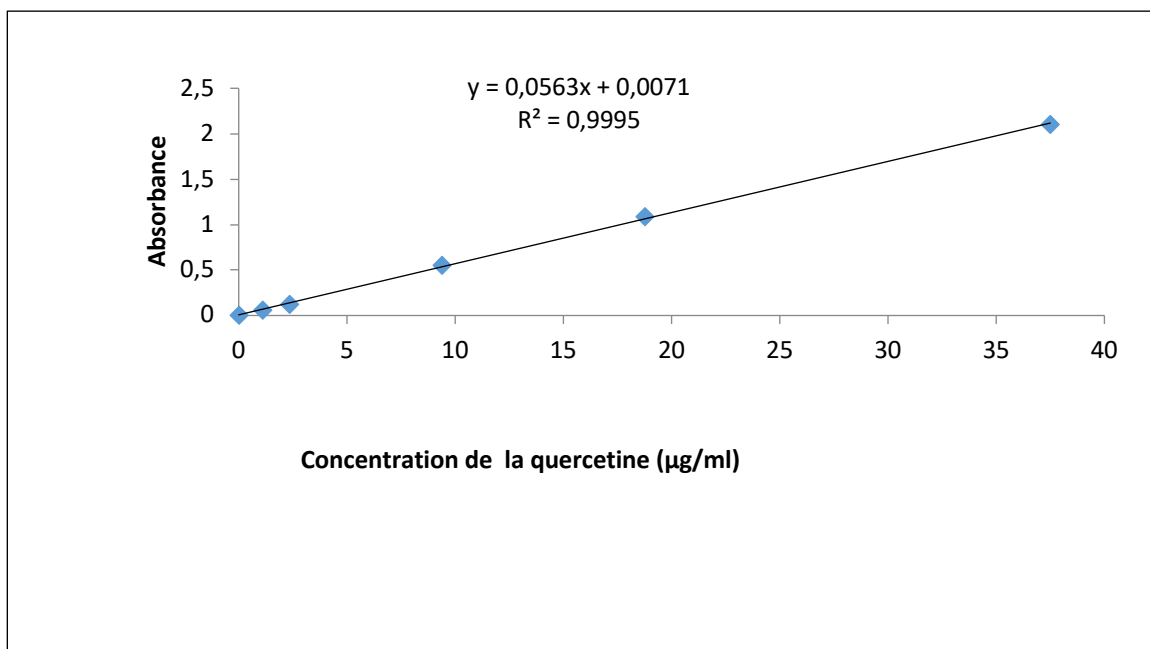


Figure 36. Courbe d'étalonnage de la quercétine.

A decorative graphic consisting of a thin vertical line on the left side, a thin horizontal line at the top, and a wider vertical grey bar on the left side, all intersecting at the top-left corner.

Travaux Scientifiques

**REGULAR ARTICLE**

Algerian *Anacyclus pyrethrum* aqueous extract: novel antioxidant and neuroprotectant activity of a chemically profiled aqueous extract

Hassiba Yahiaoui¹, Melanie-Jayne Howes², Samuel Ohiomakhare⁴, Ahmed M'Hamedi^{1,3*} and Paul L Chazot⁴

¹Laboratory of Structure Determination, Development, and Application of Molecular Material, Department of Chemistry, University of Abdelhamid Ibn Badis BP 227, Mostaganem 27000, Algeria

²Jodrel Labroatory, Kew Gardens, Royal Botanic Gardens, Richmond, TW9 3AE, UK

³Chemistry Department, College of Sciences and Humanities, Prince Sattam bin Abdulaziz University, P.O. Box 83, 11942, Al Kharj, Saudi Arabia

⁴Department of Biosciences, Durham University, South Road, Durham, DH13LE, UK

ARTICLE INFO**Article History:**

Received: 26 Jun 2018

Revised: 23 Aug 2018

Accepted: 26 Nov 2018

***Corresponding Author:**

Email:

ahmed.mhamedi27@gmail.com

Telephone: +966 583905053

Keywords: Algerian, *Anacyclus pyrethrum*, neuroprotection, flavonoids, anti-oxidant, calcium signalling

ABSTRACT

Anacyclus pyrethrum (L.) Lag. has a long tradition of medical use in Algeria. We report for the first time the antioxidant, functional and neuroprotective properties of this plant from Algeria. Differences in biochemical and physiological properties for the aqueous and methanol extracts of *A. pyrethrum* are reported and related to the main chemical constituents. The *A. pyrethrum* extracts contained amino acids, caffeoylquinic acids, *N*-feruloyltyramine and alkaloids, including including *N*-alkylamides, common in this plant species. Aqueous extracts (0.1 mg/ml) are neuroprotective against H₂O₂-induced oxidative stress, while methanol extracts (high phenolic content), despite significant antioxidant and free-radical scavenging activity, caused dysregulation of calcium signalling in neurons and was not apparently neuroprotective. Such knowledge can provide incentive for the sustainable cultivation of Algerian *A. pyrethrum*, with the aim of supporting conservation strategies and preserving biodiversity.

1. Introduction

The number of people suffering from neurological disorders has lately increased worldwide, especially in developed countries (Sanders and Morano, 2008). Amongst them, neurodegenerative diseases (Parkinson's and Alzheimer's disease) as well as psychiatric disorders (anxiety and depression) are the most common ones which has led to an increased need for new antioxidant and neuroprotective drugs. Antioxidant compounds have received significant attention as potential treatments for a variety of brain abnormalities, and evidence

suggests that antioxidant compounds can be beneficial for the nervous system (Slemmer and Weber, 2014).

Anacyclus pyrethrum (L.) Lag., a member of the Asteraceae family, is a western Mediterranean species with a restricted distribution in Morocco, Algeria and southern Spain. This species has been classified as vulnerable, according to the International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List of Threatened Species (IUCN, 2017). The population trend of *A. pyrethrum* is decreasing; indeed the number of mature individuals and the popula-

tion density have been significantly reduced during the last decades and the species occurs often in small fragmented subpopulations due to many threats. *A. pyrethrum* has been used as a traditional medicinal plant in different regions of the world including Morocco (Jamila and Mostafa, 2014 ; Ouarghidi et al., 2017) India (Kalim et al., 2010), Iran (Abdollahi Fard and Shojaii, 2013) and Algeria (Selles et al., 2013). Overharvesting of such medicinal plants from the wild has contributed to their decline and risk of becoming endangered, particularly when the plant part of medicinal interest is the root. Strategies to protect *A. pyrethrum* populations in Morocco have included planting trials, monitoring and promoting sustainable harvesting practices and protecting cultivation areas from poaching (Ouarghidi et al., 2017). It is recognised that medicinal plants such as *A. pyrethrum* often have a long tradition of use and will likely continue to be in demand for medicinal applications and for trade to support livelihoods. It is in this context that scientific research to assess the biological activities and chemical constituents of medicinal plants can contribute to understanding their value to some communities. Such knowledge can provide further incentive for the sustainable cultivation and uses of medicinal plants such as *A. pyrethrum*, with the aim of supporting conservation strategies and preserving biodiversity.

In this present study, we explored for the first time the chemical, antioxidant, neurotoxicity and neuroprotection properties of aqueous and alcoholic extracts of Algerian *A. pyrethrum*.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), penicillin-streptomycin, fetal bovine serum (FBS), sodium pyruvate and Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) were obtained from Gibco (England). 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (England).

2.2 Plant material

The roots of *A. pyrethrum* was collected from the region of Tagdemt 8 km of Tiaret (Algeria) and the plant material was identified and authenticated by Dr Sekkal F.Z., Department of Biology, Faculty of Nature and Life sciences, University of Mostaganem (Algeria). A Voucher specimen (*Anacyclus pyrethrum* O-002849) is deposited at the herbarium

of the University of Oran.

2.3 Preparation of plant extracts

2.3.1 Water extract

The powder of the *A. pyrethrum* (500 g) was placed in distilled water (2 L) in a round bottom flask (simple maceration process) for 48 hours. The water extract was filtered and water was evaporated under reduced pressure using a rotavapor at 60°C.

2.3.2 Methanol extract

Milled *A. pyrethrum* (100 g) and methanol (1 L) were put in a 2 L round bottom flask. The mixture was heated with stirring in water bath at 60°C for 20 min and the mixture was filtered. This procedure was repeated three times using the same batch. The filtrates were combined and the solvent was removed *in vacuo* at 40°C.

2.4 Determination of total phenolic content

The total phenolic content was estimated by the Folin-Ciocalteu colorimetric method, based on the procedure of Singleton and Rossi (1965), using Gallic acid as a standard phenolic compound. Briefly, 50 µl (three replicates) of extracts (1 mg/ml) were mixed with 450 µl of distilled water and 2.5 ml of 0.2 N Folin-Ciocalteu reagent. After 5 min, 2 ml of saturated sodium carbonate (75 g/l) was added. The absorbance of the resulting blue-coloured solution was measured at 765 nm after incubation at 30°C for 1.5 h with intermittent shaking. Quantitative measurements were performed, based on a Standard calibration curve of seven points 0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 mg/ml of Gallic acid. The total phenolic content was expressed as gallic acid equivalents (GAE) in µg/mg of dry extract.

2.5 Determination of flavonoids content

The total flavonoid content of extract was determined by Lamaison and Carnet (1990) method. An aliquot (1.5 ml) of appropriately diluted sample solution was mixed with 1.5 ml of AlCl₃.6H₂O (2%). The mixture was thoroughly mixed and allowed to stand for 10 min at room temperature. Absorbance of the mixture was determined at 440 nm versus a prepared blank, Quercetin, as a standard compound for the quantification of total flavonoid content. All values were expressed as quercetin equivalent in µg/mg of dry extract. Data were recorded as mean ± SD for three independent replicates.

2.6 LC-UV-MS/MS analysis method

The *A. pyrethrum* root extracts were subjected to LC–UV–MS/MS analysis using a Thermo Scientific system consisting of an ‘Accela’ U-HPLC unit with a photodiode array detector and an ‘LTQ Orbitrap XL’ mass spectrometer fitted with an electrospray source (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Chromatography was performed on 5 µl sample injections onto a 150-mm x 3 mm, 3 µm Luna C-18 column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) using the following 400µl/min mobile phase gradient of H₂O/CH₃OH/CH₃CN +1% HCOOH: 90:0:10 (0 min), 90:0:10 (5 min), 0:90:10 (60 min), 0:90:10 (65 min), 90:0:10 (67 min), 90:0:10 (70 min) followed by return to start conditions and equilibration in start conditions for 5 min before the next injection. The ESI source was operated with polarity switching and the mass spectrometer was set to record high resolution (30 k resolution) MS1 spectra (*m/z* 125–2000) in positive mode using the orbitrap and low resolution MS1 spectra (*m/z* 125–2000) in negative mode and data dependent MS2 and MS3 spectra in both modes using the linear ion trap. Detected compounds were assigned by comparison of accurate mass data (based on ppm), and by available MS/MS data, with reference to the published compound assignment system (Schymanski et al., 2014) and with supportive UV spectra.

2.7 Determination of antioxidant activity

2.7.1 Reducing power or Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP)

The total antioxidant capacity of the sample was determined using the FRAP assay of Oyaizu (1986). The assay is a simple, rapid and reproducible assay. It is universal and can be applied to plants, plasmas and organic and aqueous extracts (Li et al., 2008). The reducing ability is generally associated with the presence of reductones, which breaks the free radical chain by donating a hydrogen atom (Sujith et al., 2011).

The presence of reducing agents in plant extracts causes the reduction of Fe³⁺/ ferricyanide complex to the ferrous form. Therefore, Fe²⁺ can be evaluated by measuring and monitoring the increase in the blue colour density in the reaction medium at 700 nm. Different concentrations of the extracts (0.030 to 1 mg/mL) in distilled water were mixed with 2.5 ml of phosphate buffer (200 mM, pH 6.6) and 2.5 ml of potassium ferricyanide (K₃Fe(CN)₆) (1%). The mixture was incubated at 50 °C in a water bath for 20 min. 2.5 ml of trichloroacetic acid (10%) was added to the mixture, which was then centrifuged

at 3000 rpm for 10 min. The upper layer of the solution (5 ml) was mixed with 5 mL of distilled water and 1 ml of FeCl₃ (0.1%) and the absorbance was measured at 700 nm. Increased absorbance of the reaction mixture indicate increased reducing power. Ascorbic acid was used as the standard compound.

2.7.2 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity

The antioxidant activity of the samples were determined using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging. In the test tubes, 1ml of DPPH in ethanol (0.1mM) was added to 3ml of extract solutions, corresponding to the concentration extract range between 0.03 and 1 mg/ml. After mixing the samples, the mixtures were maintained in the dark, at room temperature for 30 min. The absorbance was measured at 517 nm using an UVmini-1240 Shimadzu spectrophotometer and compared with a control without extract. Ascorbic acid was used as standard reference. Antioxidant activity was expressed as a percent inhibition of DPPH radical and calculated from the equation: *Scavenging activity (%) = 100 [(Abs control – Abs sample)/Abs control]*. IC₅₀ values were determined from the plotted graphs of scavenging activity Vs the concentration of the extracts. These values are defined as inhibitory concentration of the extract necessary to decrease the initial DPPH radical concentration by 50% and are expressed in mg/ml. Triplicate measurements were carried out.

2.8 Cell viability assay

The viability of the CAD neuronal cells was determined by using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] assay, which is based on the reduction of a tetrazolium salt by mitochondria aldehydehydrogenases in viable cells (Abuhamdah et al., 2015). CAD cells were plated in 24-well tissue culture plates. A series of concentrations of *A. perythrum* water and methanol extracts were prepared: 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.000 1mg/ml using 10 µl of dimethylsulfoxide (DMSO) as the initial diluent, and thence water, then added to the 24-well plate, and incubated at 37°C (5% CO₂). After 24 hours of drug treatment, 50 µl Phosphate Buffered Saline (PBS) (136.9 mM 2.68 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.4) containing 5 mg/ml MTT was added to each well and incubated at 37°C (5% CO₂) for 2.5 hours. Then MTT-containing medium was removed, placed in Eppendorf and centrifuged for 10 min at 13000 rpm, and finally

250 µl isopropanol was added to the pellet to dissolve the purple crystals. The optical density of 100 µl samples were spectrophotometrically read at 596 nm (ThermoLabsystems Multiskan Ascent, V1.3). The relative cell viability was determined by the amount of MTT converted to the insoluble formazan salt compared to control (sham PBS-treated). Absorbance reduction of the samples viability was determined by absorbance reduction of the samples at various concentrations when compared with untreated control (100%). All data are presented as mean ± standard deviation (SD) for at least 4 replicates for each prepared sample.

2.9 Neuroprotection assay

A stock solution of H₂O₂ (2500 µM) in PBS was freshly prepared. A series of concentrations were then prepared using Dulbecco's modified eagles' medium DMEM/F-12 Media - GlutaMAX™-I supplemented with 10% FBS to achieve final concentrations of 250 µM. Sub-confluent cultures (70-80%) was dislodged by gentle pipetting; transferred to a 15 ml falcon tube and centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes at 4°C. The pellet was resuspended in DMEM/F-12 Media GlutaMAX™-I supplemented with 10% FBS. The cell suspension was immediately plated in 24-well plates and incubated at 37°C and 5% CO₂. After 24 hours, the cells were pretreated with two concentrations of *A. pyrethrum* (L.) Lag (0.01 and 0.1 mg/ml) followed by 2.5 hours treatment with 250 µM H₂O₂. The choice of *A. pyrethrum* (L.) concentrations was initially investigated from the neurotoxicity test. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay was performed to quantify surviving viable cells.

The choice of extract concentrations was initially investigated by applying different concentrations of the extract (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1mg/ml) for 24h to CAD cell cultures. Viability of neurons was assayed using a standard MTT assay (Abuhamdah et al., 2015). Survival of CAD cells was assessed by the MTT assay, after 24 hr pre-treatment with extract at 37 °C.

2.10 Calcium imaging assay

A 2 mM stock of the CalciumGreen™ (Invitrogen, UK) probe was prepared in DMSO and this was kept at -20°C. On the day of the imaging experiments, the probe stock was brought to room temperature and then diluted in HEPES physiological buffer (150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl₂,

5 mM KCl) to a 1µM solution. The cells were plated in flat bottom microdishes (brand: 60 µ-Dish, 35mm, Ibidi GmbH). The cells were washed with 1ml of physiological buffer and incubated for 40 min in 1 ml of the probe solution. After the incubation period, the cells were incubated in this buffer till the start of the imaging experiments. All the extract samples applied to the neuronal cells during the experiments were dissolved in the HEPES physiological buffer as stock solutions 10x more concentrated than the final desired concentration for the experiments. Depolarisation was achieved by applying 50 mM KCl to the cells. Cell bodies were isolated and regions of interest identified and isolated by selecting their corresponding areas. The graphs of fluorescence intensity divided by the corresponding area versus time (in imaging cycles) were then plotted. The reported figures corresponds to isolated cells with the strongest basal signals, gathered from n = 10 cell replicates from three separate experiments.

3. Results

3.1 The phytochemistry of Algerian *A. pyrethrum*

3.1.1 Phenol and Flavanoid content

The determination of the total phenol and flavonoid contents in the two extracts of *Anacyclus pyrethrum* was carried out separately using classic colorimetric methods.

The results show that the methanol extract had a significantly higher total phenol content relative to that of the aqueous extract, while the aqueous extract contains the higher content of flavonoid ($p < 0.01$, t -test).

Plant	<i>A. pyrethrum</i> (Phenolics)	<i>A. pyrethrum</i> (Flavanoids)
Methanol extract	33.83 ± 2.02	0.84 ± 0.00
Water extract	24.83 ± 1.60	1.40 ± 0.02

Table 1: Total phenolics and flavonoids content.

The total phenol content estimated by the Folin-Ciocalteu method for each extract was reported in µg equivalent gallic acid (AGE)/ mg of plant extract. The total flavonoid content of extract was determined by Lamasion and Carnet (1990) method, and reported in (µg quercetin (QE)/mg of extract)

3.1.2 Detailed chemistry of *A. pyrethrum* root extracts

High resolution LC-UV-MS/MS analysis revealed the detection of different compound classes in the aqueous and methanol extracts of *A. pyrethrum* root. The detected compounds were assigned from

Assigned compound [#] (or isomer)	Retention time (min)	Molecular formula	(m/z)	Ion	A. pyrethrum root water extract ppm [#]	A. pyrethrum root methanol extract ppm [#]
Alkaloid	1.8	C ₇ H ₁₃ NO ₂	144.1022	[M + H] ⁺	2.670	1.629
Leucine/isoleucine	1.9	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132.1022	[M + H] ⁺	2.383	2.004
Leucine/isoleucine	2.5	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132.1020	[M + H] ⁺	1.247	1.702
Phenylalanine	3.1	C ₉ H ₁₁ NO ₂	166.0864	[M + H] ⁺	1.053	1.956
Caffeoylquinic acid	4.5	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.1031	[M + H] ⁺	2.736	2.820
Tryptophan	4.6	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	205.0977	[M + H] ⁺	2.466	3.344
Caffeoylquinic acid	5.9	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.1025	[M + H] ⁺	2.651	1.806
Hydroxy-dimethoxycoumarin	6.4	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	223.0607	[M + H] ⁺	2.579	1.928
Dicaffeoylglucaric acid	6.8	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₄	535.1096	[M + H] ⁺	2.482	1.903
Roseoside	7.4	C ₁₉ H ₃₀ O ₈	387.2024	[M + H] ⁺	2.623	2.468
Alkaloid	8.9	C ₂₆ H ₃₆ N ₂ O ₇	489.2601	[M + H] ⁺	1.108	0.045
Alkaloid	9.3	C ₂₆ H ₃₆ N ₂ O ₇	489.2599	[M + H] ⁺	0.740	1.987
Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	9.9	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	517.1354	[M + H] ⁺	2.915	2.567
Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	10.8	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	517.1351	[M + H] ⁺	Nd	2.083
Propenyl-benzenetriol; di-Me ether, pentosyl-hexoside	11.9	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₂	506.2246	[M + NH ₄] ⁺	2.841	2.169
<i>N</i> -Feruloyltyramine	12.0	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	314.1395	[M + H] ⁺	2.691	0.940
6-Hydroxypellitorine*	16.5	C ₁₄ H ₂₅ NO ₂	240.1962	[M + H] ⁺	1.434	2.516
2,8-Decadiene-4,6-diyonic acid; 2-methylpropylamide, <i>N</i> -Me* (or) 2,4-Undecadiene-8,10- diyonic acid; 2- methylpropylamide*	16.6	C ₁₅ H ₁₉ NO	230.1543	[M + H] ⁺	2.430	1.343
Alkaloid	17.1	C ₁₈ H ₂₇ NO ₃	306.2071	[M + H] ⁺	2.449	2.547
Alkaloid	17.2	C ₁₈ H ₂₇ NO ₃	306.2073	[M + H] ⁺	3.069	2.155
<i>N</i> -(2-Phenylethyl)-2,4- undecadiene-8,10-diyamide*	17.5	C ₁₉ H ₁₉ NO	278.1541	[M + H] ⁺	3.808	0.608
Alkaloid	17.6	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	288.1600	[M + H] ⁺	2.117	0.625
Alkaloid	17.8	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	286.1442	[M + H] ⁺	0.437	0.105
2,4-Decadienoic acid isobutyla- mide*	19.6	C ₁₄ H ₂₅ NO	224.2011	[M + H] ⁺	0.743	0.807
Methylpellitorine	20.3	C ₁₅ H ₂₇ NO	238.2168	[M + H] ⁺	2.472	0.961
Dodecadienoic acid isobutyla- mide*	20.8	C ₁₆ H ₂₉ NO	252.2328	[M + H] ⁺	4.198	2.533
Dodecadienoic acid isobutyla- mide*	21.3	C ₁₆ H ₂₉ NO	252.2324	[M + H] ⁺	3.643	0.868
<i>N</i> -(4-Hydroxyphenethyl)-2,4- tetradecadienamide*	21.7	C ₂₂ H ₃₃ NO ₂	344.2589	[M + H] ⁺	2.714	1.377
2,4-Tetradecadienoic acid iso- butylamide*	22.5	C ₁₈ H ₃₃ NO	280.2640	[M + H] ⁺	3.243	1.744
<i>N</i> -Isobutyl-hexadecadienamide (or) 2-Hexadecenoic acid pyrro- lidide	23.6	C ₂₀ H ₃₇ NO	308.2955	[M + H] ⁺	1.520	2.396
Octadecadienoic acid; pyrroli- dide	23.9	C ₂₂ H ₃₉ NO	334.3106	[M + H] ⁺	2.957	0.594
Octadecatrienoic acid; pipe- ridide	24.6	C ₂₃ H ₃₉ NO	346.3105	[M + H] ⁺	2.569	0.227
2-Octadecenoic acid; piperidide	26.5	C ₂₃ H ₄₃ NO	350.3419	[M + H] ⁺	5.133	0.424
Eicosadienoic acid; piperidide	26.7	C ₂₅ H ₄₅ NO	376.3579	[M + H] ⁺	2.679	1.298
Eicosadienoic acid; piperidide	27.6	C ₂₅ H ₄₅ NO	376.3581	[M + H] ⁺	Nd	1.776

Table 2: Assigned compounds from LC-UV-MS/MS analysis of the *A. pyrethrum* root extracts.

All compounds assigned by comparison of accurate mass data (based on ppm[#]), and by interpretation of available MS/MS and/or UV spectra.

Nd: Not detected / below level of detection. *Reported to occur in *Anacyclus* species (CCD, 2018).

their observed $[M + H]^+$ (or $[M + NH_4]^+$) ions, accurate mass (ppm), and from available supportive UV spectra (Table 2). The compounds detected included those assigned as amino acids, caffeoylquinic acids, *N*-feruloyltyramine and alkaloids; with the latter including compounds assigned as *N*-alkylamides, which have previously been reported to occur in *A. pyrethrum* root (Boonen et al., 2012).

3.2 Antioxidant activity

3.2.1 Reducing power assay (FRAP)

Antioxidant activity of methanol and water extracts of *A. pyrethrum* was determined compared to Ascorbic acid as control. The reducing power is presented as an IC_{50} value; concentrations of the antioxidant providing 50% reduction in the test solution (IC_{50}) were calculated. Both extracts, whether aqueous or methanol, had similar reductive power $IC_{50}=0.66\pm 0.05$ mg/ml and $IC_{50}=0.63\pm 0.065$ mg/ml, respectively. IC_{50} for ascorbic acid is 0.018 ± 0.003 mg/ml.

3.2.2 DPPH scavenging activity

The antioxidant activity of the extracts were determined by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) test system. DPPH scavenging activity is presented as an IC_{50} value. Concentrations of the antioxidant providing 50% inhibition of DPPH in the test solution (IC_{50}) were calculated. The weakest radical scavenging activity (0.382 ± 0.11 mg/ml) was exhibited by the *A. pyrethrum* water extract, whereas the strongest activity (0.043 ± 0.00 mg/ml) was exhibited by *A. pyrethrum* methanol extract. IC_{50} for Ascorbic acid is 0.00051 mg/ml

3.3 Neurotoxicity

3.3.1 Neuroprotection assay

The neuroprotective properties of *A. pyrethrum* water and methanol extracts were assessed versus oxidative-stress ($250 \mu M$)-induced neurotoxicity

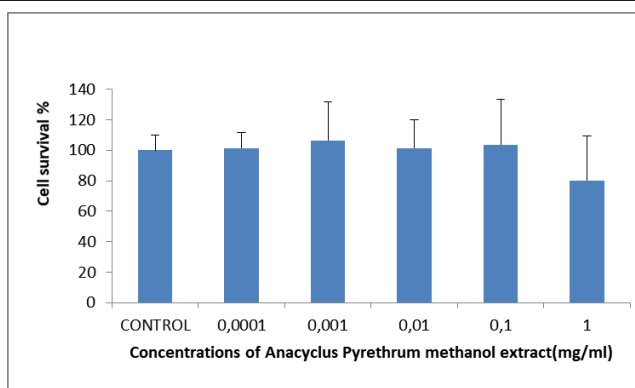
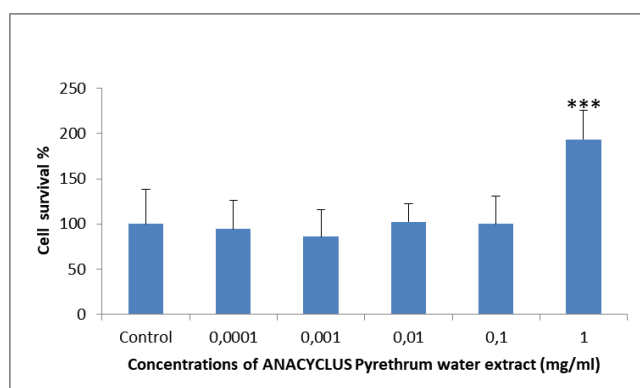


Figure 1: 24 hours Treatment of CAD cell cultures with Anacyclus pyrethrum water and methanol extract.

Concentrations 0.0001-0.1 mg/ml elicited no neurotoxic effect upon CAD cells for both extracts. In fact, at 1 mg/ml, Anacyclus pyrethrum water extract elicited an apparent higher level of cell survival/proliferation at 24 h, *** $p < 0.001$ compared to the control using a two-way ANOVA post-hoc statistical test).

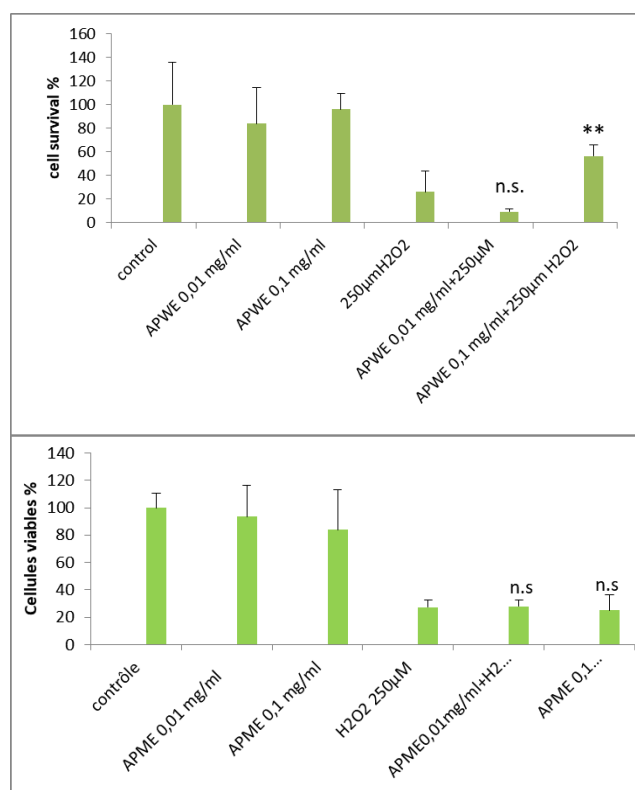


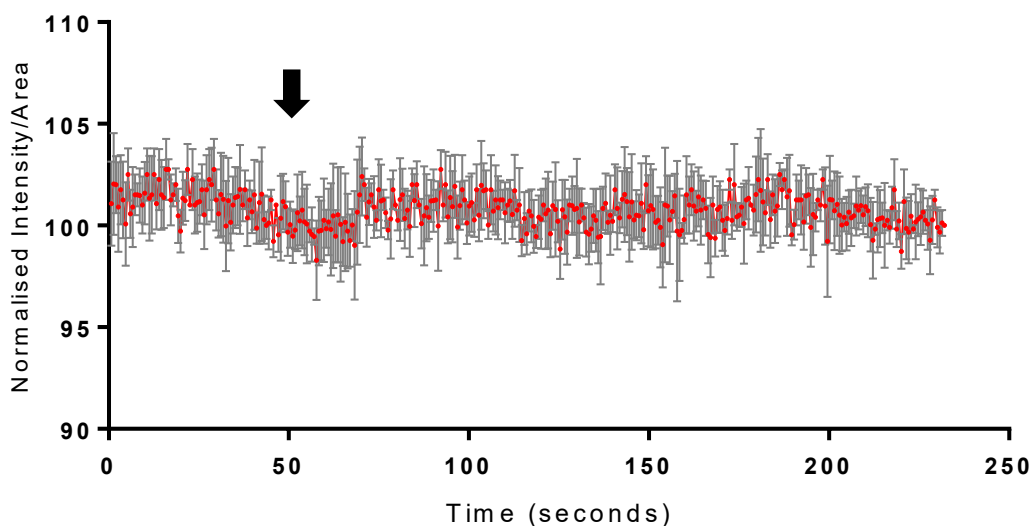
Figure 2: Neuroprotection of CAD neuronal cells with *A. pyrethrum*

A. pyrethrum water (0.1mg/ml), but not methanol, extract elicited a significant neuroprotection from 2 hours $250 \mu M$ hydrogen peroxide insult. Values are mean \pm SD for $n=4$ replicates. ** $p < 0.01$ compared to cells treated with $250 \mu M$ H_2O_2 using a two-way ANOVA post-hoc test; n.s = non-significant.

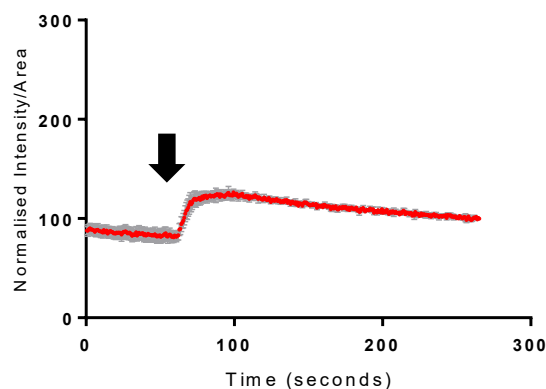
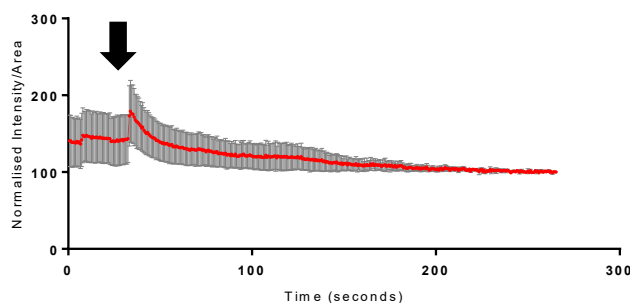
using concentrations of 0.01 and 0.1 mg/ml of extracts.

3.3.2 Calcium Imaging assay

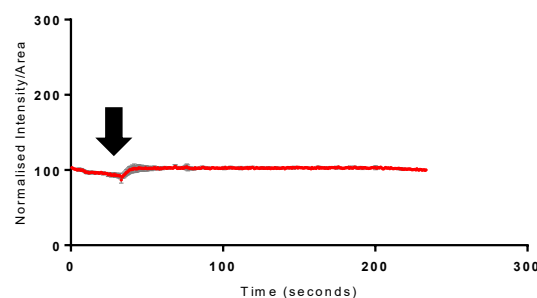
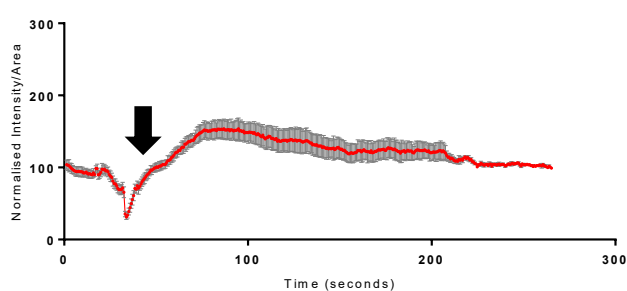
In order to assess the functional properties of *A. Pyrethrum* water and methanol extracts, a series of calcium imaging experiments were performed. The



A. *Pyrethrum* Water extract (A) and Methanol (B) extract.



C. Effect of *A. Pyrethrum* extracts upon depolarisation response (50 mM KCl).



D. Depolarisation in presence of *A. Pyrethrum* water extract (0.1 mg/ml)

E. Depolarisation in presence of *A. Pyrethrum* methanol extract (0.1 mg/ml).

effects of the extracts alone and on depolarisation responses were investigated (Figure 3A and B).

4. Discussion

A. Pyrethrum water and methanol extracts were analysed for phenolic and flavonoid content. Flavonoid-like compounds appear to be more significant with respect to neuroprotective properties as higher in *A. Pyrethrum* water extract (1.40 µg QE/mg of extract) than *A. Pyrethrum* methanol extract (0.84 µg QE/mg of extract). Despite this, quercetin itself

was not detected by LC-MS. In contrast, the amount of total phenolics is higher (33.83 µg AGE/mg of extract) in *A. Pyrethrum* methanol extract than water extract (24.83 µg AGE/mg of extract), which bears more relationship to its antioxidant properties. Flavonoids can protect the brain by their ability to modulate intracellular signals promoting cellular survival. Quercetin and structurally related flavonoids (myricetin, fisetin, luteolin) showed a marked cytoprotective capacity in *in vitro* experimental conditions in models of predominant-

ly apoptotic death such as that induced by oxidative stress induced by H₂O₂ added to PC12 cells in culture (Dajas et al., 2003). Flavonoids act by inhibiting several steps in this process, including lipid peroxidation and scavenging free radicals (Dajas et al., 2003). Although polyphenols such as anthocyanins and flavonols may exert some of their neuroprotective effects by acting directly as antioxidants, they likely have other important effects, such as scavenging reactive nitrogen species, activating protective cell signalling pathways, or altering the expression of various protective proteins. (Schaffer and Halliwell., 2012). The antioxidant activity of the methanolic and aqueous extracts of the plants was evaluated in this study. Both extracts exhibited a clear radical scavenging activity at all tested concentrations. In our studies, the methanolic extract displayed more effective radical scavenging activity than the aqueous extract. This was comparable to Sujith et al. (2012) who found an IC₅₀ of ethanol extract of Indian *A. pyrethrum* was 0.056 mg/ml. Our results demonstrate a positive correlation between free radical scavenging and the phenolic contents of the two extracts.

Interestingly, the methanol extract despite containing a higher phenol content than the water extract, its higher free-radical scavenging and antioxidant appears not to endow neuroprotective properties in this oxidative-stress model. In contrast, the water-extract displays a neuroprotective property. As discussed before, the water-extract of this plant contains a higher amount of flavonoids than methanol-extract. Flavonoids exert a multiplicity of neuroprotective actions within the brain, These effects appear to be underpinned by two common processes. Firstly, they interact with critical protein and lipid kinase signalling cascades in the brain leading to an inhibition of apoptosis triggered by neurotoxic species and to a promotion of neuronal survival and synaptic plasticity. Secondly, they induce beneficial effects on the vascular system leading to changes in cerebrovascular blood flow capable of causing angiogenesis, neurogenesis and changes in neuronal morphology (Vauzour et al., 2008). The use of flavonoid-rich plant or food extracts in humans and animal dietary supplementation studies have shown improvements in cognition function possibly by protecting vulnerable neurons, enhancing existing neuronal function or by stimulating neuronal regeneration (Youdim and Joseph, 2001).

Little is known regarding the physiological effects of

A. Pyrethrum. Under physiological conditions, electrical pulses or receptor-mediated stimuli in the neuron generate different Ca²⁺ signals with distinct spatial dimensions and temporal profiles (Zundorf and Reiser, 2011). Post-synaptically, a transient rise of the calcium level in dendritic spines is essential for the induction of activity-dependent synaptic plasticity (Zucker, 1999). The *A. Pyrethrum* extracts applied to the neuronal cells elicited no clear or modest effects on cell body calcium levels for the water and methanol extracts, respectively. But interestingly, the water extract appeared to extend the depolarisation response, (perhaps linked to its neuroprotective property). and in contrast the methanol extract dramatically suppressed the depolarisation response. Dysregulation of Ca²⁺ can be decisive for brain cell death. Interactions between Ca²⁺ and reactive oxygen species coordinate signalling can be either beneficial or detrimental. In neurodegenerative disorders, cellular Ca²⁺-regulating systems are compromised in both directions. Oxidative stress, perturbed energy metabolism, and alterations of disease-related proteins result in Ca²⁺ dependent synaptic dysfunction, impaired plasticity, and neuronal loss (Zundorf and Reiser, 2011). The contrasting effects of the extracts on functional responses may account for the neuroprotective properties and apparent lack of toxicity for the water extract. The contrasting suppression of depolarisation response indicates calcium dysregulation which may underlie the apparent lack of neuroprotective effects. Interestingly, our results for the Algerian plant are in contrast to the study of Sujith et al. (2011) who showed that *A. Pyrethrum* methanol extract was capable of scavenging hydrogen peroxide and being neuroprotective in a dose-dependent manner; the source of this plant is India (hilly regions of Pathanamathitta district of Kerala). This may be due to region-specific chemical differences.

5. Conclusion

This encouraging pharmacological profile warrants further investigation by attempting to identify the Algerian *A. Pyrethrum* water extract constituents responsible for this positive neuroprotective activity.

Acknowledgements H. Y. thanks the Algerian Ministry of Higher Education.

References

Abdollah FM, Shojaii A (2013) Efficacy of Iranian traditional medi-

- cine in the treatment of epilepsy. *BioMed Research International* 2013:692-752.
- Abuhamdah S, Abuhamdah R, Howes MJR, Al-Olimat S, Ennaceur A, Chazot PL (2015) Pharmacological and neuroprotective profile of an essential oil derived from leaves of *Aloysia citrodora Palau*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 67: 1306-1315.
- Boonen J, Sharma V, Dixit VK, Burvenich C, De Spiegeleer B. (2012) *N*-alkylamide profiling of an ethanolic *Anacyclus pyrethrum* root extract. *Planta Medica* 78: 1787-1795.
- Dajas F, Rivera-Megret F, Blasina F, Arredondo F, Abin-Carriquiry JA, Costa G, Echeverry C, Lafon L, Heizen H, Ferreira M, Morquio A (2003) Neuroprotection by flavonoids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36: 1613-1620
- Jamila F, Mostafa E (2014) Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *Journal of Ethnopharmacology* 154: 76-87.
- Kalim MD, Bhattacharyya D, Banerjee A, Chattopadhyay S (2010) Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of plants used in Unani system of medicine. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 10: 77.
- Lamaison JLC, Carnet A (1990). Teneurs en Principaux Flavonoides des fleurs de *Crataegus Monogyna* Jacq et de *Crataegus Laevigata* (Poiret D. C) en Fonction de la Vegetation. *Pharmaceutica. Acta Helvetia* 65:315-320.
- Li H, Qiu N, Ding H, Yao R (2008) Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. *Food Research International* 41: 363-370.
- Neher E, Sakaba T (2008) Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron* 59: 861-872.
- Ouarghidi A, Powell B, Martin GJ, Abbad A (2017) Traditional sustainable harvesting knowledge and distribution of a vulnerable wild medicinal root (*A. pyrethrum*) in Ait M'hamed Valley, Morocco. *Economic Botany* 71: 83-95.
- Oyaizu M (1986) Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine *Japan Journal of Nutrition* 44: 307-15.
- Park SJ, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, Luo H, Ke H, Rehmann H, Taussig R, Brown AL, Kim MK, Beaven MA, Burgin AB, Manganiello V, Chung JH (2012) Resveratrol Ameliorates Aging-Related Metabolic Phenotypes by Inhibiting cAMP Phosphodiesterases. *Cell* 165: 421-433.
- Sanders S, Morano C (2008) Alzheimer's disease and related dementias. *Journal of Gerontological Social Work* 250:1-214.
- Shahidi F (2000) Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung* 44: 158-163
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
- Schaffer S, Halliwell B (2012) Do polyphenols enter the brain and does it matter? Some theoretical and practical considerations. *Genes & Nutrition* 7: 99-109.
- Schymanski EM, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, Hollander J (2014) Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environmental Science and Technology* 48: 2097-2098.
- Selles C, El Amine Dib M, Djabou N, Beddou F, Muselli A, Tabti B, Costa J, Hammouti B (2013) Antimicrobial activity and evolution of the composition of essential oil from Algerian *Anacyclus pyrethrum* L. through the vegetative cycle. *Natural Product Research* 27: 2231-2234.
- Slemmer JE, Weber JT (2014) Assessing Antioxidant Capacity in Brain Tissue: Methodologies and Limitations in Neuroprotective Strategies 3: 636-648.
- Sujith K, Ronald-Darwin C, Suba V (2011) Antioxidant activity of ethanolic extract of *Anacyclus pyrethrum*. *International Journal of Pharmaceutics* 2: 222-226.
- Sujith K, Darwin CR, Suba V (2012) Memory-enhancing activity of *Anacyclus pyrethrum* in albino Wistar rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4: 307-311.
- Van houten B, Woshner V, Santos JH (2006) Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair* 2: 145-152.
- Vauzour D, Vafeiadou k, Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Spencer JPE (2008) The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes & Nutrition* 3: 115-126.
- Youdim KA, Joseph JA (2001) A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. *Free Radical Biology and Medicine* 30: 583-594.
- Zucker RS (1999) Calcium and activity dependent synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology* 3: 305-313.



**South Asian Journal
of Experimental Biology**



ABOUT THE JOURNAL: SAJEB (eISSN: 2230-9799) is a peer-reviewed, open-access and online journal aimed at advancement and rapid dissemination of scientific knowledge generated by the highly motivated researchers in the field of biological sciences through publication of high-quality original research and critical up-to-date review articles covering all the aspects of biological sciences. Every year, it publishes six issues. SAJEB has received Global Impact Factor (GIF)-2015, 0.765; Index Copernicus Value-2015, 93.0 and NAAS (ICAR)-India 2017 rating, 4.79. SAJEB has been included in the ISI master list of journals of Thomson Reuters under Zoological Record. The SAJEB is also covered by CABI (UK), AGRICOLA, NLM catalogue, CAS (ACS, USA), DOAJ, Journal TOCs (ICBL, Edinburgh), Directory of research Journals Indexing (DRJI) and Indian Science Abstracts (ISA, NISCAIR).