

AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ AIX-MARSEILLE

Discipline

PATHOLOGIE HUMAINE-MALADIES INFECTIEUSES

**DÉVELOPPEMENT DE FORMES VECTORISABLES INNOVANTES
DANS LE CADRE DE MALADIES LIÉES À L'ÂGE**

Présentée et soutenue à huis-clos par

Samy ISKANDAR

Le 11 décembre 2019

Devant le jury composé de :

Pr. Michelle SERGENT	Aix-Marseille Université	Président du jury
Dr. Maryline VIAN	Avignon Université	Rapporteur
Dr. Nicolas BALDOVINI	Université Nice Sophia Antipolis	Rapporteur
Pr. Farid CHEMAT	Avignon Université	Examineur
Dr. Maxime ROBIN	Aix-Marseille Université	Co-directeur de thèse
Pr. Philippe PICCERELLE	Aix-Marseille Université	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée à l'Université Aix-Marseille, dans le cadre d'une convention CIFRE, gérée par l'Association Nationale de la Recherche Technique (ANRT), et établie entre le Laboratoire de bio-ingénierie pharmaceutique, service de pharmacie galénique, biopharmacie et cosmétologie de la faculté de pharmacie et la société AROMA THERAPEUTICS. Les travaux présentés dans cette thèse, n'auraient pu se faire sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes. Je ne peux commencer la présentation de ces travaux sans remercier l'ensemble de ces personnes.

Ayant réalisé cette thèse conjointement au sein du département de bio-ingénierie pharmaceutique, service de pharmacie galénique, biopharmacie et cosmétologie de la faculté de pharmacie, je tiens tout d'abord à remercier le chef du département et mon directeur de thèse monsieur le professeur **Philippe PICCERELLE** pour m'avoir permis de mener ces travaux dans de très bonnes conditions. Ses qualités pédagogiques remarquables ont contribué à l'avancement de mon travail en ne négligeant ni ses conseils avisés et ni ses critiques constructives. C'est un honneur pour moi de travailler avec lui et je ne peux qu'admirer son talent. Je lui suis infiniment reconnaissant.

Je tiens à remercier particulièrement le président d'AROMA THERAPEUTICS, Monsieur **Laurent MOY**, et le président de LAPHAL INDUSTRY Monsieur **Druon NOTÉ** sans qui, cette thèse CIFRE n'aurait sûrement jamais vu le jour.

J'adresse de chaleureux remerciements à mon co-directeur **Dr Maxime ROBIN** qui a dédié beaucoup de temps à mon travail en étant toujours très disponible. Ses réponses m'ont toujours éclairci les idées. J'admire toujours son savoir ainsi que sa capacité à l'exposer et à le partager.

Je souhaite aussi manifester tous mes remerciements et ma vive reconnaissance à mes coordinateurs scientifiques à l'entreprise, monsieur **Romain LECOZANNET** et madame **Maria KATSOGIANNOU**, pour leur sens de l'encadrement, leur aide, leurs conseils et leur suivi.

Mes remerciements vont également au **Dr. Jean LORQUIN**, de m'y avoir accueilli chaleureusement dans son laboratoire d'analyses chimiques avec les meilleures conditions de travail.

Je voudrais aussi remercier **Dr. Christophe SAUZET** pour les nombreuses discussions que nous avons eues et pour son aide constante. Son soutien sa présence au sein du Laboratoire de Pharmacie Galénique ont été indispensables pour mon travail. J'ai énormément apprécié son enthousiasme et sa sympathie. Son expertise, sa franchise et son objectivité ont été plus que salutaires encore une fois.

J'adresse également mes remerciements aux membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de rapporter ma thèse et pour l'intérêt qu'ils ont porté à ces travaux.

*Par ailleurs, je tiens également à adresser mes sincères remerciements aux personnes non encore citées dont les professeurs, les permanents, les anciens et futurs docteurs ainsi que les stagiaires qui ont contribué à créer une atmosphère de travail agréable et conviviale. Une pensée toute particulière à **Pascal, Hervé, Florence, Caroline** et **Guy** pour leur soutien mutuel, leurs encouragements, leur bonne humeur, leurs savoirs scientifiques et leurs échanges amicaux pendant ces quatre années. Enfin merci à tous ceux qui d'une façon ou d'une autre, m'ont apporté une aide scientifique, matérielle ou administrative.*

Comment ne pas remercier l'ensemble de mes proches et de ma famille. Je pense tout d'abord à mes parents qui m'ont toujours épaulé dans mes études, mes décisions et mes choix, même si je n'ai pas pu être à leurs côtés pendant une longue période. Votre amour, votre confiance et votre soutien sans faille m'auront permis de surmonter bien des épreuves. Ce travail est autant le mien que le vôtre.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	1
RÉSUMÉ.....	7
SUMMARY	8
LISTE DES ABRÉVIATIONS	9
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES TABLEAUX.....	15
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	16
CHAPITRE 1 – ÉTAT DE L’ART	19
1 La maladie d'Alzheimer	19
1.1 Histoire	19
1.2 Généralités	19
1.2.1 Prévalence.....	20
1.2.2 Les symptômes de la démence d'Alzheimer.....	22
1.2.3 Diagnostic de la démence d'Alzheimer	23
1.3 Les changements cérébraux associés à la maladie d'Alzheimer.....	24
1.4 MCI : un précurseur potentiel de la maladie d'Alzheimer et d'autres démences.....	25
1.5 Anomalies génétiques associées à la maladie d'Alzheimer	26
1.5.1 Mutations génétiques.....	26
1.5.2 Le syndrome de Down.....	27
1.6 Facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer	27
1.6.1 Âge.....	27
1.6.2 Antécédents familiaux	28
1.6.3 Gène ApoE-e4	28
1.7 Facteurs de risque modifiables	29
1.7.1 Facteurs de risque des maladies cardiovasculaires	29
1.7.2 Éducation	30
1.7.3 Engagement social et cognitif.....	31
1.8 Traitements de la démence d'Alzheimer.....	31
1.8.1 Traitements pharmacologiques	31
1.8.2 Thérapies non pharmacologiques	32
1.8.3 Vivre avec la démence d'Alzheimer.....	33
1.9 Histopathologie.....	33
1.9.1 Les plaques séniles.....	34

1.9.2	<i>Les dégénérescences neurofibrillaires</i>	35
1.9.3	<i>L'hypothèse amyloïde</i>	35
2	La médecine traditionnelle	39
2.1	Généralités	39
2.2	Mode d'action des plantes	39
2.2.1	<i>Renforcement</i>	40
2.2.2	<i>Potentialisation</i>	40
2.2.3	<i>Retenue et désintoxication</i>	41
2.2.4	<i>Neutralisation</i>	41
2.2.5	<i>Incompatibilité</i>	42
2.3	Médecine traditionnelle Chinoise et maladie d'Alzheimer	42
2.4	SuHeXiang Wan	43
2.4.1	<i>Liquidambar orientalis</i>	44
2.4.1.1	<i>Propriétés</i>	44
2.4.1.2	<i>Principaux constituants</i>	44
2.4.2	<i>Aquilaria agallocha</i>	45
2.4.2.1	<i>Propriétés</i>	45
2.4.2.2	<i>Principaux constituants</i>	45
2.4.3	<i>Boswellia carteri</i>	46
2.4.3.1	<i>Propriétés</i>	46
2.4.3.2	<i>Principaux constituants</i>	46
2.4.4	<i>Santalum album</i>	46
2.4.4.1	<i>Propriétés</i>	47
2.4.4.2	<i>Principaux constituants</i>	47
2.4.5	<i>Styrax benzoin</i>	47
2.4.5.1	<i>Propriétés</i>	48
2.4.5.2	<i>Principaux constituants</i>	48
2.4.6	<i>Eugenia caryophyllata</i>	48
2.4.6.1	<i>Propriétés</i>	49
2.4.6.2	<i>Principaux constituants</i>	49
2.4.7	<i>Cyperus rotundus</i>	49
2.4.7.1	<i>Propriétés</i>	50
2.4.7.2	<i>Principaux constituants</i>	50
2.4.8	<i>Saussurea lappa</i>	50

2.4.8.1	<i>Propriétés</i>	51
2.4.8.2	<i>Principaux constituants</i>	51
2.4.9	<i>Dryobalanops aromatica</i>	51
2.4.9.1	<i>Propriétés</i>	52
2.4.9.2	<i>Principaux constituants</i>	52
3	Introduction à la galénique.....	53
3.1	Étymologie.....	53
3.1.1	<i>Qu'est-ce qu'une forme galénique ?</i>	53
3.1.2	<i>Les principales formes galéniques</i>	53
3.2	La voie orale	53
3.2.1	<i>Anatomie de l'épithélium intestinal</i>	55
3.3	Absorption intestinale.....	58
3.3.1	<i>Transport passif</i>	58
3.3.2	<i>Transport actif</i>	58
3.4	Système nerveux central et barrières cérébrales	59
3.4.1	<i>Barrière hémato-encéphalique (BHE)</i>	60
3.5	Techniques développées pour améliorer la biodisponibilité orale	63
3.6	Systèmes émulsionnés et innovations pharmaceutiques	63
3.6.1	<i>Les cyclodextrines</i>	64
3.6.2	<i>Les microémulsions</i>	65
3.6.3	<i>Les nanoparticules comme véhicules pour traverser la BHE</i>	66
3.7	Nanoparticules lipidiques solides (SLN).....	67
3.7.1	<i>SLN en tant que système d'administration de médicaments vers le SNC</i>	68
3.8	Production des SLN.....	70
3.8.1	<i>Homogénéisation à haute pression (HPH)</i>	70
3.8.1.1	<i>Homogénéisation à chaud</i>	70
3.8.1.2	<i>Homogénéisation à froid</i>	70
3.8.2	<i>Ultrasonication</i>	71
3.8.3	<i>Émulsification/Évaporation du solvant</i>	72
3.9	Conclusion du chapitre 1	74
	CHAPITRE 2 - TRAVAUX PERSONNELS	75
4	PARTIE 1. EXTRAIT AT000	77
4.1	Article publié	77
5	PARTIE 2. EXTRAIT AT00X	102
5.1	Préparation de l'extrait AT00X en résine.....	103

5.2	Évaluation des activités biologiques de l'extrait AT00X.....	104
5.2.1	Tests d'évaluation de l'activité antioxydante.....	104
5.2.1.1	Test DPPH.....	104
5.2.1.2	Test ORAC.....	106
5.2.1.3	Test KRL.....	107
5.2.1.4	Test ABTS.....	109
5.2.2	Test d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	111
5.2.2.1	Culture cellulaire.....	112
5.2.3	Évaluation de l'activité neuroprotectrice de l'extrait AT00X.....	115
5.2.3.1	Culture primaire de neurones corticaux.....	116
5.2.3.2	Composé d'essai et exposition humaine à l'A β ₁₋₄₂	117
5.2.3.3	Organisation de plaques de culture.....	117
5.2.3.4	Coloration sur cellules vivantes pour évaluation des ROS.....	118
5.2.3.5	Coloration des neurones et des neurites.....	118
5.2.3.6	Activité de l'acétylcholinestérase (AChE).....	118
5.2.3.7	Analyses statistiques.....	119
5.2.3.8	Résultats du test in vitro.....	119
5.2.3.9	Coloration des neurones et des neurites.....	122
5.3	Conclusion sur les activités biologiques de l'extrait AT00X.....	124
6	Partie 3. Optimisation de l'extrait AT00X.....	125
6.1	Introduction des plans d'expériences.....	125
6.2	Méthodologie des surfaces de réponse.....	127
6.3	Optimisation de l'extrait AT00X.....	129
6.3.1	Analyse graphique du modèle.....	131
6.3.2	Surfaces de réponses.....	131
6.3.3	Courbes isoréponses.....	131
6.4	Fonctions de désirabilité.....	134
6.5	Contrainte réglementaire et extrait AT33B.....	138
6.6	Évaluation des activités biologiques des extraits AT33X et AT33B.....	138
6.6.1	Résultat du test DPPH des extraits AT33X et AT33B.....	139
6.6.2	Résultat du test ORAC de l'extrait AT33B.....	140
6.6.3	Résultat du test KRL des extraits AT33X et AT33B.....	140
6.6.4	Résultat du test ABTS de l'extrait AT33B.....	142
6.6.5	Résultat de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire (AT33X et AT33B)..	142

6.6.6	<i>Résultat de l'activité neuroprotectrice in vitro de l'extrait AT33B</i>	143
6.7	Activité neuroprotectrice de l'extrait AT33B in vivo	147
6.7.1	<i>Protocole de l'étude</i>	148
6.7.2	<i>Résultat du test de l'alternance spontanée dans le labyrinthe en Y</i>	149
6.7.3	<i>Résultat du test d'évitement passif « Step-Through Passive Avoidance »</i>	149
6.7.4	<i>Résultat du test de l'alternance spontanée dans le labyrinthe en Y</i>	151
6.7.5	<i>Résultat du test d'évitement passif « Step-Through Passive Avoidance »</i>	151
6.8	Conclusion sur les activités biologiques de l'extrait AT33B	152
7	PARTIE 4. ÉTUDE ANALYTIQUE	154
7.1	Identification chimique des extraits par HPLC	154
7.1.1	<i>Méthode d'analyse par HPLC</i>	155
7.1.2	<i>Protocole</i>	155
7.1.3	<i>Résultats</i>	156
7.2	Identification par GC-MS	157
7.2.1	<i>Protocole</i>	158
7.2.2	<i>Résultats</i>	159
7.3	Discussion de la composition de l'extrait AT33B	161
7.3.1	<i>Acides phénoliques</i>	161
7.3.2	<i>Vanilline</i>	162
7.3.3	<i>Eugénol</i>	162
7.3.4	<i>Acide cinnamique</i>	163
7.3.5	<i>Acide gallique</i>	163
7.3.6	<i>Acide isopimarique</i>	164
	CHAPITRE 3. GALÉNIQUE	165
7.4	Matériels et méthodes	166
7.4.1	<i>Les lipides</i>	166
7.4.2	<i>Le tensioactif</i>	166
7.4.3	<i>Co-tensioactif</i>	167
7.5	Préparation des SLN	168
7.5.1	<i>Protocole</i>	168
7.5.1	<i>Solvant</i>	170
7.6	Optimisation de la formulation galénique	171
7.6.1	<i>Choix du plan</i>	172
7.6.2	<i>WSP design</i>	172
7.6.3	<i>Plan d'expériences</i>	173

7.6.4	<i>Analyse graphique du modèle</i>	177
7.6.5	<i>Analyse de la taille</i>	177
7.6.6	<i>Analyse du potentiel zêta</i>	181
7.6.7	<i>Analyse de l'index de polydispersité PDI</i>	183
7.6.8	<i>Désirabilité</i>	186
7.7	Caractérisation des SLN	190
7.7.1	<i>Taille des Particules</i>	190
7.7.2	<i>Potentiel zêta</i>	191
7.7.3	<i>PDI</i>	193
7.7.4	<i>Stabilité des SLN</i>	194
7.7.5	<i>Efficacité d'encapsulation des SLN</i>	196
7.7.5.1	<i>Dosage de l'extrait AT00X dans les SLN</i>	197
7.7.6	<i>Dialyse à l'équilibre</i>	199
7.7.6.1	<i>Cinétique de libération</i>	201
7.7.7	<i>Stabilité après lyophilisation</i>	203
7.8	<i>Analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC)</i>	205
7.9	Caractérisation des SLN par microscopie électronique à balayage	209
7.9.1	<i>Phase liquide diluée (1/20)</i>	209
CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES		212
ANNEXE 1		215
ANNEXE 2		217
ANNEXE 3 : TRAVAUX COLLABORATIFS SUR DES EXTRAITS BIOACTIFS		218
Article 1 : revue de littérature.....		218
Article 2.....		229
ANNEXE 4 : POSTER TURIN-2018		218
BIBLIOGRAPHIE		241

RÉSUMÉ

La maladie d'Alzheimer est une maladie dégénérative du cerveau où s'accumulent des substances chimiques anormales responsables d'une détérioration progressive de la mémoire et des capacités intellectuelles. C'est une maladie neuro dégénérative qui provoque des lésions dans le cerveau. Les lésions irréversibles conduisent à un déclin des fonctions cognitives, qui servent à traiter l'information, et comportementales au fur et à mesure de la progression de la maladie. Pertes de mémoire immédiate, puis des souvenirs plus anciens, modifications du jugement et du raisonnement, changements d'humeur et de comportement en sont les principales manifestations.

Contrairement à une idée reçue, la maladie d'Alzheimer n'est pas liée au vieillissement normal du cerveau. Aujourd'hui, le coût de la maladie en Europe est estimé à 160 Millions d'euros/an, malgré ça, il n'y a pas de traitement symptomatique efficace.

Les nouvelles approches non médicamenteuses doivent être explorées afin de ralentir la progression de la maladie. La recherche dans le domaine du « *Drug Delivery System* » révèle des systèmes de plus en plus prometteurs. L'adressage de molécules d'intérêt thérapeutique vers un tissu cible est un défi de taille à rechercher en matière de « *Drug Delivery* ». De nouvelles technologies de ciblage sont apparues. La recherche de vecteurs ayant une durée de vie suffisamment longue dans le corps pour atteindre la zone cible a déjà été mise en place. Ce travail constitue un pas modeste dans l'exploration de la phytothérapie nanovectorisée pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

SUMMARY

Alzheimer's disease is a degenerative brain disease where abnormal chemicals accumulate causing progressive deterioration of memory and intellectual ability. It is a neurodegenerative disease that causes lesions in the brain. Irreversible lesions lead to a decline in cognitive functions, which serve to process information, and behavioral as the disease progresses. Loss of immediate memory, and then older memories, changes in judgment and reasoning, changes in mood and behavior are the main manifestations.

Contrary to popular belief, Alzheimer's disease is not related to the normal aging of the brain. Today, the cost of the disease in Europe is estimated at 160 million euros/year, despite that, there is no effective symptomatic treatment.

New non-drug approaches should be explored to slow the progression of the disease. Research in the field of the "Drug Delivery System" reveals increasingly promising systems. Addressing molecules of therapeutic interest to a target tissue is a major challenge in Drug Delivery. New targeting technologies have emerged. The search for vectors having a sufficiently long life in the body to reach the target area has already been put in place. This work is a modest step in the exploration of nanovectorized herbal medicine for the treatment of Alzheimer's disease.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A β : amyloïdes bêta

ABTS : acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

AChE : acétylcholinestérase

AICD: Amyloid precursor protein Intracellular Cytoplasmic/C-terminal Domain

APP: Amyloid Precursor Protein

ApoE : Apolipoprotein E

BDNF : brain-derived neurotrophic factor

BHE : barrière hémato-encéphalique

BHLCR : barrière hémato-liquide céphalorachidien

CD : Cyclodextrines

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

DNF : dégénérescences neurofibrillaires

DO : densité optique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

DSC : Differential scanning calorimetry

FDA: Food and Drug Administration Américaine

FHA : filaments hélicoïdaux appariés

ICV : intracérébroventriculaire

KRL : Kit Radicaux Libres

MA : maladie d'Alzheimer

MCI: Mild Cognitive Impairment

MEB : Microscopie électronique à Balayage

MSR : méthodologie de la surface de réponse

MT : microtubules

MTC : médecine traditionnelle chinoise

ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity

PO : *per os*

POE : Polyoxyéthylène

POP : Polyoxypropylène

ROS : Reactive oxygen species

SFD : Space-Filling Designs

SLN : Solid Lipid Nanoparticles

SNC : système nerveux central

STPA : Step-Through Passive Avoidance

TGI : tractus gastro-intestinal

TSI : Turbiscan Stability Index

LISTE DES FIGURES

Fig. 1. Population vieillissante : population mondiale projetée âgée de 60 ans ou plus.	21
Fig. 2. Infographie de l'impact global de la démence.	22
Fig. 3. Représentation schématique du métabolisme du précurseur de la protéine β -amyloïde (APP) selon la voie amyloïdogénique.	34
Fig. 4. La protéine tau et ses différents états d'agrégation.	35
Fig. 5. Hypothèse de la cascade amyloïde, qui progresse de la génération du peptide bêta-amyloïde à partir de la protéine précurseur amyloïde, en passant par plusieurs étapes secondaires jusqu'à la mort cellulaire	38
Fig. 6. <i>Liquidambar orientalis</i> .	44
Fig. 7. Résine du <i>Liquidambar orientalis</i> .	44
Fig. 8. <i>Aquilaria agallocha</i> .	45
Fig. 9. Bois de cœur de l' <i>Aquilaria agallocha</i> .	45
Fig. 10. <i>Boswellia carteri</i> .	46
Fig. 11. Oliban du Yémen.	46
Fig. 12. <i>Santalum album</i> .	47
Fig. 13. Bois de cœur du <i>Santalum album</i> .	47
Fig. 14. <i>Styrax benzoin</i> .	48
Fig. 15. Résine du styrax (benjoin).	48
Fig. 16. <i>Eugenia caryophyllata</i> .	49
Fig. 17. Clou de girofle.	49
Fig. 18. <i>Cyperus rotundus</i> .	50
Fig. 19. Tubercules du <i>Cyperus rotundus</i> .	50
Fig. 20. <i>Saussurea lappa</i> .	51
Fig. 21. Racines du <i>Saussurea lappa</i> .	51
Fig. 22. <i>Dryobalanops aromatica</i> .	52
Fig. 23. Fruit du <i>Dryobalanops aromatica</i> .	52
Fig. 24. Différents sites d'absorption du tractus gastro-intestinal.	54
Fig. 25. Schéma des différents composants de l'épithélium intestinal.	56
Fig. 26. Les différents types de jonctions entre les cellules épithéliales.	57
Fig. 27. Passage des molécules à travers la barrière intestinale par 1) transport passif et 2) transport actif.	59
Fig. 28. Schéma des trois principales barrières entre le sang et le cerveau. (a) La barrière hémato-encéphalique (BHE). (b) La barrière hémato-liquide céphalorachidien (BHLCR). (c) La barrière d'arachnoïde.	60
Fig. 29. Représentation structurelle d'une unité neurovasculaire : la BHE composée de cellules endothéliales cérébrales, les péricytes, astrocytes et les microglies.	61
Fig. 30. Différentes voies de passage à travers la barrière hémato-encéphalique. a) Diffusion paracellulaire. b) Diffusion transcellulaire. c) Transport facilité. d) Endocytose et transcytose à médiation par un récepteur. e) Endocytose et transcytose par adsorption.	62
Fig. 31. Types et tailles de diamètre de gouttelettes typiques des macro, nano et microémulsions. Lors de l'addition de surfactant, les queues de surfactant non polaires s'orientent vers la phase huileuse interne, tandis que les groupes de tête de surfactant polaire s'orientent vers la phase aqueuse externe.	64
Fig. 32. Structure Générale des Cyclodextrines.	64
Fig. 33. Schéma structurel fonctionnel de α -CD (n = 6), de β -CD (n = 7) et de γ -CD (n = 8). En bas : dimensions géométriques des cyclodextrines.	65
Fig. 34. Représentation schématique du mécanisme d'émulsification des microémulsions.	66
Fig. 35. Microscopie électronique à balayage de SLN chargées de médicament.	67
Fig. 36. Mécanismes de libération d'actifs distribués sous forme de SLN.	68
Fig. 37. Représentation schématique du mécanisme d'homogénéisation à haute pression pour la préparation des SLN.	71
Fig. 38. Réduction de la taille des gouttelettes d'émulsion par ultrasons.	72

Fig. 39. Représentation schématique de la technique d'émulsification/évaporation de solvant pour la préparation des SLN.	73
Fig. 40. Schéma résumant les 4 parties du chapitre 2.	76
Fig. 41. Préparation de l'extrait au laboratoire. 1) Extraction, 2) Filtration, 3) Évaporation, 4) Extrait AT00X en résine.	103
Fig. 42. Production industrielle de l'extrait. 1) Extraction, 2) Filtration, 3) Évaporation, 4) Séchage sous vide, 5) Extrait AT00X en poudre.	103
Fig. 43. Résultat du test DPPH de l'extrait AT00X.	105
Fig. 44. Résultat du test KRL de l'extrait AT00X.	108
Fig. 45. Equivalents mg de Trolox et mg d'Acide gallique/g d'extrait.	109
Fig. 46. Résultat du test ABTS de l'extrait AT00X.	110
Fig. 47. Activité anti-inflammatoire de l'extrait AT00X.	113
Fig. 48. Effet d'AT00X sur la survie des neurones et le réseau de neurites des neurones corticaux primaires de rat intoxiqués par le peptide $A\beta_{1-42}$ (24h, 20 μ M correspondant à 2 μ M de $A\beta$ O). Les données exprimées en pourcentage de contrôle montrent la moyenne \pm SEM (100% = pas de $A\beta$, pas de composé). ANOVA à un facteur suivie du test de Dunnett, n = 4-6. * p < 0,05 était considéré comme significatif.	119
Fig. 49. Effet d'AT00X sur la production de ROS dans les neurones corticaux primaires de rat (MAP-2 positif) intoxiqués par le peptide $A\beta_{1-42}$ (24h, 20 μ M correspondant à 2 μ M de $A\beta$ O). Les données exprimées en pourcentage de contrôle montrent la moyenne \pm SEM (100% = pas de $A\beta$, pas de composé). ANOVA à un facteur suivie du test de Dunnett, n = 4-6. * p < 0,05 était considéré comme significatif.	120
Fig. 50. Effet d'AT00X sur l'activité de l'Acétylcholinestérase. Les données exprimées en pourcentage de contrôle montrent la moyenne \pm SEM (100% = pas de composé). Test T Fisher, * p < 0,05.	121
Fig. 51. Coloration des neurones et du réseau des neurites après traitement par l'extrait AT00X.	122
Fig. 52. Représentation des niveaux bas et haut d'un facteur ainsi que son domaine de variation.	125
Fig. 53. Chaque facteur est représenté par un axe gradué et orienté. Les axes des facteurs sont orthogonaux entre eux. L'espace ainsi défini est l'espace expérimental.	126
Fig. 54. Dans l'espace expérimental, les niveaux des facteurs définissent des points expérimentaux.	126
Fig. 55. Les points expérimentaux sont disposés dans le domaine d'étude défini par l'expérimentateur.	127
Fig. 56. Graphe des fonctions de désirabilité.	134
Fig. 57. Activité antioxydante selon le test DPPH des extraits optimisés AT33X et AT33B.	139
Fig. 58. Graphe représentant l'augmentation du $T_{1/2}$ hémolyse du sang témoin selon le test KRL.	140
Fig. 59. Graphe représentant les équivalents mg de Trolox et mg d'acide gallique/g d'extrait.	141
Fig. 60. Résultat du test ABTS de l'extrait AT33B.	142
Fig. 61. Effet de l'extrait AT33B sur la survie des neurones (A) et le réseau de neurites (B) des neurones corticaux MAP-2. Le BDNF a été utilisé comme contrôle positif. Les données exprimées en pourcentage de contrôle montrent la moyenne \pm SEM. ANOVA à un facteur suivie du test de Dunnett. * p < 0,05 était considéré comme significatif.	143
Fig. 62. Effet de l'extrait AT33B sur la production de ROS dans une culture primaire mixte de neurones corticaux. Le BDNF a été utilisé comme contrôle positif. Les données ont été exprimées en pourcentage de contrôle en moyenne \pm SEM. ANOVA à un facteur suivie du test de Dunnett. * p < 0,05 était considéré comme significatif.	144
Fig. 63. Effet de l'extrait AT33B sur l'activité de l'Acétylcholinestérase. Les données exprimées en pourcentage de contrôle montrent la moyenne \pm SEM (100% = pas de composé). Test T Fisher, * p < 0,05.	145
Fig. 64. Coloration des neurones et du réseau des neurites après traitement par l'extrait AT33B.	146
Fig. 65. Croquettes chargées en actifs (extrait AT33B et Bacopa).	147
Fig. 66. Effets de l'extrait AT33B et du Bacopa administrés p.o. pendant 23 jours sur des déficits d'alternance spontanée induits par $A\beta_{25-35}$ chez la souris. V, solution de véhicule. *** p < 0,001, * p < 0,05 par rapport au groupe Sc.A β ; ### p < 0,001 par rapport au groupe traité avec $A\beta_{25-35}$; test de Dunnett.	149
Fig. 67. Effets de l'extrait AT33B et du Bacopa administrés p.o. pendant 23 jours sur les déficits d'évitement passif induits par $A\beta_{25-35}$ chez la souris. V, solution de véhicule. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 par rapport au groupe Sc.A β ; ## p < 0,01, ### p < 0,001 par rapport au groupe traité par $A\beta_{25-35}$; test de Dunnett.	149

Fig. 68. Effets de l'extrait AT33B et du Bacopa administrés p.o. (DMSO 5%) sur des déficits d'alternance spontanée induits par A β ₂₅₋₃₅ chez la souris. V, solution de véhicule. *** p <0,001, * p <0,05 par rapport au groupe Sc.A β ; ### p <0,001 par rapport au groupe traité avec A β ₂₅₋₃₅ ; test de Dunnett.	151
Fig. 69. Effets de l'extrait AT33B et du Bacopa administrés p.o. (DMSO 5%) sur les déficits d'évitement passif induits par A β ₂₅₋₃₅ chez la souris. V, solution de véhicule. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 par rapport au groupe Sc.A β ; ## p <0,01, ### p <0,001 par rapport au groupe traité par A β ₂₅₋₃₅ ; test de Dunnett.	151
Fig. 70. Schéma du principe de l'HPLC.	154
Fig. 71. Chromatogramme de l'élution par HPLC de l'extrait AT00X.	156
Fig. 72. Chromatogramme de l'élution par HPLC de l'extrait AT33B.	156
Fig. 73. Schéma du principe de la chromatographie gazeuse (GC-MS).	158
Fig. 74. Chromatogramme de l'analyse par GC-MS de l'extrait AT00X.	159
Fig. 75. Chromatogramme de l'analyse par GC-MS de l'extrait AT33B.	160
Fig. 76. Schéma de préparation des SLN par la méthode d'Ultrasonication. 1. Mélange à l'Ultraturax 15200rpm/10 min ; 2. Sonication à 70 % pendant 12 min ; 3. Refroidissement dans un bain d'eau glacé.	168
Fig. 77. Illustration de l'algorithme WSP dans un espace 2D.	173
Fig. 78. Plan uniforme selon le modèle "Space-Filling Design".	175
Fig. 79. Surface plot (cube + coupe) – réponse : taille (nm) – variables plan de coupe : Lutrol (g) – Compritol (g). Variable fixée : Tween 80 : 2 g, 6 g et 10 g.	178
Fig. 80. Surface plot (cube + coupe) – réponse : taille (nm) – variables plan de coupe : Tween 80 – Compritol (g). Variable fixée : Lutrol : 1 g, 4,5 g et 8 g.	179
Fig. 81. Surface plot (cube + coupe) – réponse : taille (nm) – variables plan de coupe : Tween 80 (g) – Lutrol (g) Variable fixée : Compritol : 5 g, 10 g et 15 g.	180
Fig. 82. Surface plot (cube + coupe) – réponse : potentiel zêta (mV) – variables plan de coupe : Tween 80 (g) – Lutrol (g) Variable fixée : Compritol : 5 g, 10 g, 15 g.	181
Fig. 83. Surface plot (cube + coupe) – réponse : potentiel zêta (mV) – variables plan de coupe : Tween 80 (g) – Compritol (g) Variable fixée : Lutrol : 1 g, 4,5 g, 8 g.	182
Fig. 84. Surface plot (cube + coupe) – réponse : potentiel zêta (mV) – variables plan de coupe : Lutrol (g) – Compritol (g) Variable fixée : Tween 80 : 2 g, 6 g, 10 g.	183
Fig. 85. Surface plot (cube + coupe) – réponse : PDI – variables plan de coupe : Lutrol (g) – Tween 80 (g) Variable fixée : Compritol : 5 g, 10 g, 15 g.	184
Fig. 86. Surface plot (cube + coupe) – réponse : PDI – variables plan de coupe : Lutrol (g) – Compritol (g), Variable fixée : Tween 80 : 2 g, 6 g, 10 g.	185
Fig. 87. Surface plot (cube + coupe) – réponse : PDI – variables plan de coupe : Tween 80 (g) – Compritol (g), Variable fixée : Lutrol : 1 g, 4,5 g, 8 g.	186
Fig. 88. Désirabilité de la taille. Type : Bilatérale ; Min : 0, Max : 200 nm, Cible : 100 nm.	187
Fig. 89. Désirabilité du potentiel zêta. Type : Unilatérale droite ; Max : -5 mV Cible : -8 mV.	188
Fig. 90. Désirabilité surface plot (Cube) - Réponse : Taille - Variables plan de coupe : Compritol (g) - Lutrol (g). Variable fixée : Tween 80 : 2 g, 10 g.	188
Fig. 91. Désirabilité surface plot (Cube) - Réponse : Taille - Variables plan de coupe : Tween 80 (g) - Lutrol (g). Variable fixée : Compritol : 5 g, 15 g.	189
Fig. 92. Distribution de taille selon le principe de la diffusion dynamique de la lumière.	190
Fig. 93. Taille et PDI de la formulation optimale SLN AT00X 38.	191
Fig. 94. Présentation schématique du potentiel zêta.	192
Fig. 95. Potentiel zêta de la formulation optimale SLN AT00X 38.	193
Fig. 96. Principe de l'analyseur de stabilité TURBISCAN.	194
Fig. 97. Profil de rétrodiffusion des SLN AT00X 38.	195
Fig. 98. Évolution du TSI des SLN AT00X 38.	196
Fig. 99. Évolution de la valeur moyenne de la rétrodiffusion des SLN AT00X 38.	196
Fig. 100. Protocole d'ultrafiltration des SLN.	197
Fig. 101. Courbe étalon de l'acide benzoïque.	198
Fig. 102. Dialyseur Dianorm.	199
Fig. 103. Macrocellule en Teflon.	199

Fig. 104. Remplissage des deux compartiments de la cellule de dialyse.	200
Fig. 105. Relargage de l'extrait encapsulé des cellules 1 et 2 après 72 h de dialyse.	200
Fig. 106. Profil de libération de l'actif en fonction du temps des SLN.	202
Fig. 107. Taille, potentiel zêta et PDI des SLN après lyophilisation.	204
Fig. 108. Schéma d'une courbe de DSC montrant les formes associées à des transitions de phase.	206
Fig. 109. Schéma du principe de la DSC.	206
Fig. 110. Résultat de l'analyse par DSC de l'actif AT00X, du corps gras Compritol et des SLN AT00X 38.	207
Fig. 111. Résultat de l'analyse par DSC des SLN AT00X 38 placebo.	208
Fig. 112. Images MEB obtenues pour la phase liquide diluée de la formulation SLN AT00X 38.	210

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Plantes de la MTC utilisées dans le cadre des maladies cognitives.	43
Tableau 2. Caractéristiques biologiques et physiques du TGI humain.	56
Tableau 3. Les parties utilisées de chaque plante constituant l'extrait AT00X.	102
Tableau 4. Valeur de la EC ₅₀ du test DPPH.	105
Tableau 5. Résultat du test ORAC de l'extrait AT00X comparé à des aliments de référence.	106
Tableau 6. Pourcentage de variation du T _{1/2} hémolyse du sang témoin.	107
Tableau 7. Equivalents mg de Trolox et mg d'acide gallique/g d'extrait.	108
Tableau 8. Valeur de la EC ₅₀ du test ABTS de l'extrait AT00X.	110
Tableau 9. Activité anti-inflammatoire de l'extrait AT00X.	113
Tableau 10. Différentes concentrations de l'extrait AT00X testées in vitro.	117
Tableau 11. Pouvoir antioxydant de l'extrait AT00X et de ses composantes végétales selon le test DPPH.	129
Tableau 12. Matrice composite du modèle.	130
Tableau 13. Variation de la réponse DPPH dans le plan en fonction de : A) Eugenia et Santalum, B) Eugenia et Aquilaria, C) Eugenia et Cyperus, D) Eugenia et Styrax.	132
Tableau 14. Coordonnées et Caractéristiques du maximum/optimum selon l'étude de désirabilité.	134
Tableau 15. Surfaces de réponses et courbes isoréponses de la variation du DPPH en fonction de l'optimum des 5 variables : A) Eugenia et Santalum, B) Eugenia et Aquilaria, C) Eugenia et Cyperus, D) Eugenia et Styrax.	135
Tableau 16. Les 4 matrices ajoutées pour améliorer les résultats DPPH.	137
Tableau 17. Résultats du test DPPH des extraits AT33X et AT33B par rapport au Trolox, Acide ascorbique et Gallate de propyle.	139
Tableau 18. Valeur du pouvoir antioxydant de l'extrait AT33B exprimée en $\mu\text{mol}/100\text{ g}$.	140
Tableau 19. Pouvoir antiradicalaire des extraits AT33X et AT33B selon le test KRL.	140
Tableau 20. Equivalents mg de Trolox et mg d'acide gallique/g d'extrait.	141
Tableau 21. Valeur de la EC ₅₀ du test ABTS de l'extrait AT33B.	142
Tableau 22. Activité anti-inflammatoire et cytotoxique des extraits AT33X et AT33B par rapport à la Dexaméthasone.	142
Tableau 23. Phase 1 de l'étude in vivo en utilisant les croquettes.	148
Tableau 24. Phase 1 de l'étude in vivo selon le gavage traditionnel.	150
Tableau 25. Molécules identifiées dans l'extrait AT00X.	160
Tableau 26. Molécules identifiées dans l'extrait AT33B.	161
Tableau 27. Comparaison du pourcentage de variation du T _{1/2} hémolyse du sang témoin en présence de l'extrait AT00X et des SLN-AT00X.	169
Tableau 28. Equivalents mg de Trolox et mg d'acide gallique/g de SLN.	169
Tableau 29. Matrice expérimentale du modèle.	174
Tableau 30. Matrice uniforme et résultats obtenus.	176
Tableau 31. Etude de désirabilité.	187
Tableau 32. Formulations optimales sélectionnées.	189
Tableau 33. Taille, potentiel zêta et PDI des 4 formulations optimales sélectionnées.	190
Tableau 34. Aires du pic des différentes quantités injectées de l'acide benzoïque.	197
Tableau 35. Aire du pic du surnageant des SLN.	198
Tableau 36. Taux de relargage d'actif des SLN.	200
Tableau 37. Cinétique de libération d'actif avec et sans SLN.	201
Tableau 38. Taille, potentiel zêta et PDI avant et après lyophilisation.	204

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative incurable du tissu cérébral qui entraîne une perte progressive et irréversible des fonctions mentales et en particulier de la mémoire. C'est la cause la plus fréquente de démence chez l'homme (Lahmy et al., 2015). La MA est caractérisée par deux lésions primaires : des plaques séniles qui sont des agrégats extracellulaires toxiques de peptides amyloïdes et des enchevêtrements neurofibrillaires qui sont des agrégats intracellulaires formés de paires de filaments hélicoïdaux dus à la formation anormale de masses de protéines tau hyperphosphorylées (Thonberg et al., 2017). Les symptômes cliniques de cette maladie incluent une perte de mémoire (Budson and Price, 2005), en particulier des événements récents au cours des phases précoces de la maladie et une détérioration d'autres fonctions cognitives qui interfèrent avec l'humeur, le raisonnement, le jugement et le langage (Chumakov et al., 2015; Katzman, 1986).

D'un point de vue histopathologique, un clivage anormal de la protéine précurseur de l'amyloïde par la bêta-sécrétase conduit à l'accumulation extracellulaire du peptide neurotoxique A β ₄₂ générant des plaques séniles compressant les neurones (Selkoe, 2004). Les peptides oligomères A β jouent un rôle important dans la neurotoxicité et le développement de la maladie d'Alzheimer (Hardy and Selkoe, 2002). Ils provoquent de fortes altérations des mécanismes de plasticité entraînant un déclin de la mémoire (Barghorn et al., 2005; Townsend et al., 2006).

Malgré les progrès scientifiques dans ce domaine, il n'existe actuellement aucun traitement efficace pour freiner la progression de la maladie et enrayer le déclin cognitif. Étant donné que les lésions cérébrales (plaques amyloïdes et dégénérescence neurofibrillaire) déclenchent une diminution du neurotransmetteur, l'acétylcholine, qui permet aux neurones de communiquer. Les options de traitement médicamenteux sont actuellement limitées aux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Les anticholinestérasiques comprennent trois molécules différentes qui ont été rigoureusement testées et se sont avérées efficaces dans les formes bénignes à modérées de la maladie : le donépézil, la galantamine et la rivastigmine (Misik et al., 2015). Ces traitements aident toutefois à stabiliser la maladie ; ils ne l'inversent ni ne le guérissent. De plus, ces molécules peuvent interagir avec un large éventail de médicaments et leur consommation est associée à de nombreux effets secondaires (Cacabelos, 2007).

Dans les thérapies non médicamenteuses, les plantes ont été utilisées pour soulager les symptômes de la MA et améliorer les fonctions cognitives. L'avantage des plantes médicinales réside dans leur richesse en composés, qui peuvent agir en synergie avec d'autres composés de la même plante ou d'une autre. Les molécules d'origine végétale peuvent également stimuler l'activité des constituants ou neutraliser les effets toxiques des composés d'autres espèces végétales (Howes and Houghton, 2003). Aujourd'hui, la médecine traditionnelle Chinoise constitue une alternative potentielle aux traitements médicamenteux.

SuHeXiang Wan, un extrait de 9 plantes utilisé dans le traitement de l'épilepsie et des convulsions, a démontré un effet sédatif et anticonvulsivant, ainsi que des effets inhibiteurs sur le système nerveux central après l'inhalation de son huile essentielle (Koo et al., 2004). Chez la souris, l'huile essentielle, SuHeXiang Wan, atténue l'altération de la mémoire induite par le peptide bêta-amyloïde (Jeon et al., 2011).

L'objectif de cette thèse est d'évaluer l'activité neuroprotectrice d'un extrait de plantes (AT000) issu de la médecine traditionnelle chinoise, utilisé pour traiter l'épilepsie et les convulsions, définir l'alimentarité des plantes, la dose et le temps de traitement efficace de la composition initiale AT000, de définir à partir d'AT000 une composition végétale optimale (AT33X) et brevetable destinée au traitement des déficits cognitifs des patients MA à un stade léger à modéré et, enfin, développer une stratégie galénique innovante pour véhiculer l'extrait au cerveau par une délivrance orale.

Le premier chapitre de ce mémoire constitue une synthèse bibliographique sur la maladie d'Alzheimer, la prévalence, les symptômes, les facteurs ainsi que les différents traitements existants. Ensuite une présentation des différentes plantes qui constituent l'extrait actif ainsi que leurs propriétés thérapeutiques. Enfin, une vision générale sur l'absorption d'actifs à travers les barrières intestinale et hémato-encéphalique et l'avantage des nanoparticules comme vecteurs d'actifs.

Le deuxième chapitre, se divise en 4 parties et présente l'étude expérimentale sur les différentes versions de l'extrait ; l'extraction des plantes, la caractérisation chimique, l'évaluation des activités biologiques in vitro/in vivo, l'optimisation de la composition en fonction de l'alimentarité des plantes et des résultats des tests in vitro et in vivo.

Le troisième chapitre présente la stratégie galénique innovante adoptée afin de véhiculer l'extrait. Cette stratégie est basée sur la formation des nanoparticules lipidiques solides. Une étude d'optimisation de la formulation galénique a été menée dans le but d'améliorer certains paramètres physico-chimiques. La formulation optimale obtenue a été validée selon des tests de caractérisation.

Enfin, une partie qui vise à discuter l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse pour les replacer dans le contexte scientifique actuel avant de conclure et d'ouvrir des perspectives pour la suite de ce projet.

CHAPITRE 1 – ÉTAT DE L'ART

1 LA MALADIE D'ALZHEIMER

1.1 Histoire

Le trouble neurologique dévastateur connu aujourd'hui comme maladie d'Alzheimer a été cliniquement reconnu au début des années 1900 par le docteur Alzheimer, un clinicien allemand travaillant à l'hôpital de Francfort. Il a eu l'occasion d'examiner Auguste Deter (51 ans), une femme qui souffrait de graves problèmes psychiatriques : démence, perte cognitive, paranoïa. Elle avait du mal à nommer des objets familiers, à écrire des phrases complètes et à se souvenir des mots, elle a éprouvé de plus en plus de problèmes de mémoire et de désorientation. Après avoir été hospitalisée, elle est morte à l'âge de 56 ans. Alois Alzheimer a examiné son cerveau et a noté la pathologie de la maladie d'Alzheimer. Bien sûr, elle n'était pas connue comme la maladie d'Alzheimer jusqu'à ce que son mentor, Emil Kraepelin ait désigné la maladie. Kraepelin s'est également intéressé à la base biologique de la maladie. C'était en même temps que Sigmund Freud était très actif, qui pensait que les maladies psychiatriques étaient des manifestations de l'éducation, et Kraepelin sentait qu'elles étaient plus de la nature et avaient une base biologique. Ce ne fut que dans les années 1970 en Angleterre, Tomlinson, Blessed, et Roth ont fait des études sur des personnes de plus de soixante-dix ans et trouvé qu'ils ont subi les mêmes changements décrits chez Auguste Deter. Et ce qui était une maladie rare des personnes d'âge moyen est devenu une condition commune et le problème de santé publique que nous souffrons maintenant par lequel des millions sont touchés dans le monde entier (Perry, 2006).

1.2 Généralités

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative progressive caractérisée par une détérioration de la fonction cognitive, en particulier la mémoire, et une altération progressive de la capacité à mener des activités de la vie quotidienne ainsi que des symptômes neuropsychiatriques et des troubles du comportement (Cummings, 2004). La MA est actuellement diagnostiquée au stade de la démence (McKhann et al., 1984). La démence est un syndrome clinique défini par le déclin cognitif global affectant la mémoire et un autre

domaine de la cognition qui interfère de manière significative avec la capacité d'accomplir des activités de la vie quotidienne (Lyketsos et al., 2006). La démence de type Alzheimer est caractérisée par l'apparition progressive et la progression du déclin principalement dans les aspects corticaux de la cognition : la mémoire, le langage, la praxis (Jalbert et al., 2008; Lyketsos et al., 2006).

Il est maintenant reconnu que les changements physiopathologiques sous-jacents associés à la MA, notamment l'accumulation de protéines amyloïdes bêta (A β) et tau dans le cerveau, peuvent commencer plusieurs années avant le diagnostic (Braskie et al., 2010; Dubois et al., 2007) et que les caractéristiques cliniques, biologiques et pathologiques de la MA surviennent progressivement le long d'un continuum de la maladie normale à la phase terminale (Jicha and Carr, 2010). On a récemment suggéré que la MA pouvait être diagnostiquée à un stade «prodromique» (c'est-à-dire début symptomatique) dans lequel les symptômes cliniques, notamment la perte épisodique de mémoire du type hippocampique, sont présents mais pas assez sévères pour affecter les activités instrumentales de la vie quotidienne ou mériter un diagnostic de démence (Dubois et al., 2010). Le diagnostic à ce stade nécessiterait également des preuves de biomarqueurs de la présence de la pathologie de la maladie d'Alzheimer.

La MA est principalement une maladie liée à l'âge et constitue la forme la plus fréquente de démence chez les personnes âgées, les taux d'incidence selon l'âge augmentant de façon exponentielle avec l'âge, après 65 ans (Fratiglioni et al., 1999; Gao et al., 1998; Jorm and Jolley, 1998; Kawas et al., 2000). Étant donné la dépendance croissante des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, cette maladie impose un fardeau considérable aux patients et aux soignants ainsi qu'à la société, grâce à l'utilisation des ressources de soins de santé (McCrone et al., 2014). Le coût social mondial de la démence, sur la base d'une population de 34,4 millions de personnes atteintes de démence, était estimé à 422 milliards de dollars en 2009, dont 142 milliards pour les soins informels (34%) (Wimo et al., 2010).

1.2.1 Prévalence

À mesure que la fertilité diminue et que l'espérance de vie augmente, la proportion de la population au-dessus d'un certain âge augmente également. Ce phénomène, connu sous le nom de vieillissement de la population, se produit dans le monde entier. Selon les données du « *World Population Prospects : the 2017 Révision* », on estime qu'en 2017, le nombre de personnes âgées de 60 ans et plus s'élevait à 962 millions, soit plus du double de ce qu'elle

était en 1980. Le nombre de personnes âgées devrait évoluer de 962 millions dans le monde en 2017 à 2,1 milliards en 2050 et 3,1 milliards en 2100 (Fig. 1). À l'échelle mondiale, la population âgée de 60 ans ou plus augmente plus rapidement que tous les groupes d'âge plus jeunes. Globalement, le nombre de personnes âgées de 80 ans ou plus devrait tripler entre 2017 et 2050, passant de 137 millions à 425 millions.

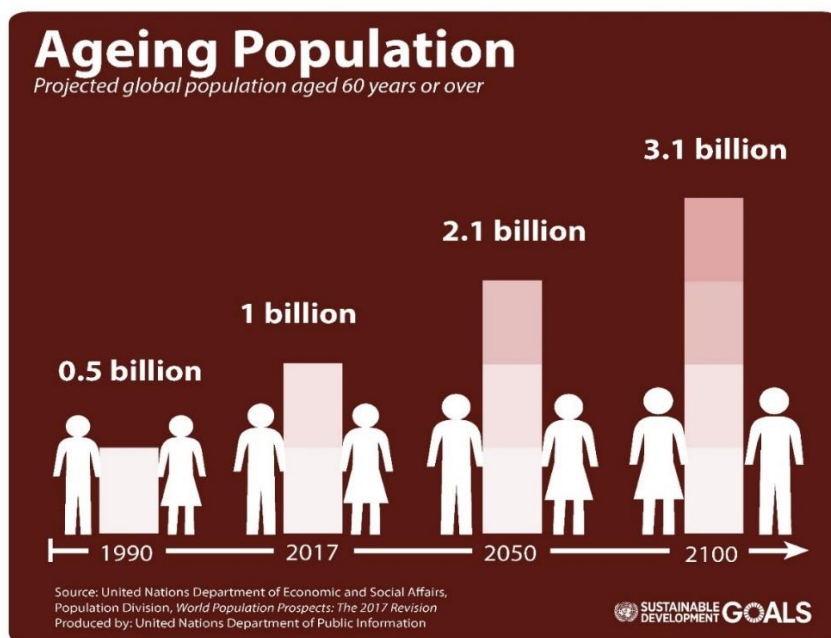


Fig. 1. Population vieillissante : population mondiale projetée âgée de 60 ans ou plus.

Compte tenu de l'imminence augmentation du nombre de personnes âgées, la prévalence de la maladie d'Alzheimer devrait augmenter considérablement dans les années à venir. En 2018, on estimait à 50 millions le nombre de personnes qui vivent avec la démence dans le monde (Fig. 2). Ce nombre devrait augmenter à plus de 152 millions d'ici 2050 (World Alzheimer Report, 2018). Selon France Alzheimer, Aujourd'hui, 900 000 personnes sont atteintes de la maladie d'Alzheimer en France. De jour en jour, la maladie gagne du terrain : près de 225 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année. D'ici 2020, la France comptera probablement 1 275 000 personnes malades et 2 150 000 patients en 2040. Cette charge croissante signifie que cette maladie devient rapidement une priorité de santé publique, d'autant plus qu'à l'heure actuelle il n'y a pas de traitements curatifs ou préventifs disponibles. Un certain nombre de pays ont annoncé des stratégies nationales de sensibilisation à cette maladie, améliorer les soins aux patients et renforcer les efforts de recherche, y compris en France.

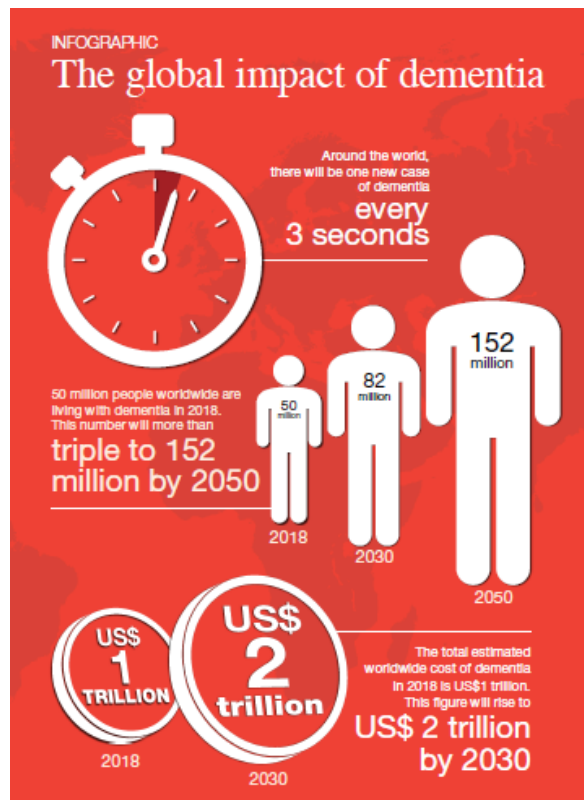


Fig. 2. Infographie de l'impact global de la démence (World Alzheimer Report, 2018).

1.2.2 Les symptômes de la démence d'Alzheimer

Les personnes atteintes de démence d'Alzheimer éprouvent de multiples symptômes qui changent au fil des ans. Ces symptômes reflètent le degré de dommages aux neurones dans différentes parties du cerveau. Le rythme auquel les symptômes progressent de légers à modérés à sévères varie d'une personne à l'autre (Phaneuf, 2007).

Au stade léger, la plupart des gens peuvent fonctionner de façon autonome dans de nombreux domaines, mais ils auront probablement besoin d'aide pour certaines activités afin de maximiser leur indépendance et rester en sécurité. Ils peuvent encore conduire, travailler et participer à des activités favorites. Au stade modéré, qui pour certains est le plus long, les individus peuvent avoir une difficulté à accomplir des tâches routinières, à se confondre et commencent à avoir des changements de personnalité et de comportement, y compris la méfiance et l'agitation. Au stade sévère, les individus ont besoin d'aide pour les activités de base de la vie quotidienne, comme se laver, s'habiller et utiliser la salle de bain. Finalement, leur capacité à communiquer verbalement est limitée.

C'est au stade sévère de la maladie que les effets de la maladie d'Alzheimer sur la santé physique d'un individu deviennent particulièrement apparents. En raison de dommages aux zones du cerveau impliqué dans le mouvement, les individus deviennent alités. Être confiné au lit les rend vulnérables à des conditions telles que les caillots sanguins, les infections cutanées et la septicémie, dans lesquelles les produits chimiques anti-infectieux dans la circulation sanguine déclenchent une inflammation à l'échelle du corps pouvant entraîner une défaillance des organes. Les dommages aux régions du cerveau qui contrôlent la déglutition rendent difficile de manger et de boire. Cela peut amener les individus à avaler de la nourriture dans la trachée (trachée) au lieu de l'œsophage (tuyau alimentaire). Les particules d'aliments peuvent se déposer dans les poumons et provoquer une infection pulmonaire. Ce type d'infection est appelé pneumonie d'aspiration, et c'est une cause qui contribue à la mort de nombreuses personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer (Villemagne et al., 2013).

1.2.3 Diagnostic de la démence d'Alzheimer

Il n'y a pas de test unique pour la démence d'Alzheimer. Au lieu de cela, les médecins (souvent avec l'aide de spécialistes comme les neurologues et les gériatres) utilisent une variété d'approches et des outils pour aider à faire un diagnostic. Ils comprennent les éléments suivants :

- Obtention d'une histoire médicale et familiale de l'individu, y compris les antécédents psychiatriques et l'histoire des changements cognitifs et comportementaux.
- Demander à un membre de la famille de fournir des commentaires sur les changements dans les compétences de pensée et le comportement.
- Effectuer des tests cognitifs et des examens physiques et neurologiques.
- Demander à l'individu de subir des tests sanguins et une imagerie cérébrale pour exclure d'autres causes potentielles de symptômes de démence, comme une tumeur ou certaines carences en vitamines.
- Dans certaines circonstances, en utilisant l'imagerie cérébrale pour savoir si l'individu a des niveaux élevés de bêta-amyloïde, une caractéristique de la maladie d'Alzheimer ; des niveaux normaux suggèrent que la maladie d'Alzheimer n'est pas la cause de la démence.

Le diagnostic de la démence d'Alzheimer nécessite une évaluation médicale minutieuse et complète. Bien que les médecins puissent presque toujours déterminer si une personne est

atteinte de démence, il peut être difficile d'en déterminer la cause exacte. Plusieurs jours ou semaines peuvent être nécessaires pour qu'un individu effectue les tests et les examens requis et que le médecin interprète les résultats et fasse un diagnostic (Reiman et al., 2012).

1.3 Les changements cérébraux associés à la maladie d'Alzheimer

Un cerveau adulte en bonne santé a environ 100 milliards de neurones, chacun avec des extensions longues et ramifiées. Ces extensions permettent aux neurones individuels de former des connexions avec d'autres neurones. Lors de ces connexions, appelées synapses, l'information circule dans de minuscules bouffées de produits chimiques qui sont libérés par un neurone et détectés par un neurone récepteur. Le cerveau contient environ 100 milliards de synapses. Elles permettent aux signaux de voyager rapidement à travers les circuits neuronaux du cerveau, créant la base cellulaire des mémoires, des pensées, des sensations, des émotions, des mouvements et des compétences.

L'accumulation du fragment protéique bêta-amyloïde (appelé plaques bêta-amyloïdes) en dehors des neurones et l'accumulation d'une forme anormale de la protéine tau (appelée tau) à l'intérieur des neurones sont deux des changements cérébraux associés à la maladie d'Alzheimer. On pense que les plaques bêta-amyloïdes contribuent à la mort cellulaire en interférant avec la communication neurone-neurone aux synapses, tandis que les enchevêtrements de tau bloquent le transport des nutriments et d'autres molécules essentielles à l'intérieur des neurones. Au fur et à mesure que la quantité de bêta-amyloïde augmente, un point de basculement est atteint au niveau duquel la protéine tau anormale se propage dans tout le cerveau (National Institutes of Health, National Institute on Aging, 2017).

D'autres changements du cerveau comprennent l'inflammation et l'atrophie. La présence de protéines bêta-amyloïdes et tau toxiques active les cellules du système immunitaire dans le cerveau appelées microglies. Les microglies essaient d'éliminer les protéines toxiques ainsi que les débris générés par les cellules mortes et mourantes. L'inflammation chronique est supposée se produire lorsque la microglie ne peut pas suivre tout ce qui doit être éliminé. L'atrophie, ou rétrécissement, du cerveau se produit à cause de la perte de cellules. La fonction cérébrale normale est en outre compromise par la capacité réduite du cerveau à métaboliser le glucose, son principal carburant.

La recherche suggère que les changements cérébraux associés à la maladie d'Alzheimer peuvent commencer 20 ans ou plus avant que les symptômes apparaissent (Jack et al., 2009).

Lorsque les changements initiaux se produisent, le cerveau les compense, permettant aux individus de continuer à fonctionner normalement. À mesure que les dommages neuronaux augmentent, le cerveau ne peut plus compenser les changements et les individus montrent un déclin cognitif subtil. Plus tard, les dommages neuronaux sont si importants que les individus montrent un déclin cognitif évident, y compris des symptômes tels que la perte de mémoire ou la confusion quant à l'heure ou au lieu. Plus tard encore, les fonctions corporelles de base telles que la déglutition sont altérées.

Alors que les milieux de recherche ont les outils et l'expertise nécessaires pour identifier certains des premiers changements cérébraux de la maladie d'Alzheimer, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour affiner l'exactitude des outils avant qu'ils deviennent disponibles pour un usage clinique (Bateman et al., 2012). En outre, les traitements pour prévenir, ralentir ou arrêter ces changements ne sont pas encore disponibles, bien que beaucoup soient testés dans des essais cliniques.

1.4 MCI : un précurseur potentiel de la maladie d'Alzheimer et d'autres démences

Le MCI (Mild Cognitive Impairment) ou « trouble cognitif léger » est une condition dans laquelle une personne a des changements légers mais mesurables dans les capacités de réflexion qui sont visibles à la personne touchée et aux membres de la famille et les amis, mais l'individu est toujours capable de mener des activités quotidiennes. Environ 15% à 20% des personnes de 65 ans et plus ont un MCI (Roberts and Knopman, 2013). Les gens avec un MCI, en particulier MCI impliquant des problèmes de mémoire, sont plus susceptibles de développer la maladie d'Alzheimer ou d'autres démences que les personnes sans MCI (Kantarci et al., 2009; Mitchell and Shiri-Feshki, 2009). Une revue systématique de 32 études a montré qu'une moyenne de 32% des individus avec MCI développaient la démence d'Alzheimer dans les 5 années de suivi (Ward et al., 2013). Une méta-analyse de 41 études a révélé que parmi les personnes atteintes de MCI qui ont été suivies pendant 5 ans ou plus, une moyenne de 38% développée la démence (Mitchell and Shiri-Feshki, 2009). Identifier quelles personnes avec MCI sont plus susceptibles de développer la maladie d'Alzheimer ou d'autres démences est un objectif majeur de la recherche actuelle.

Les normes révisées pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer publiées en 2011 (Albert et al., 2011; Jack et al., 2011; McKhann et al., 2011; Sperling et al., 2011), suggèrent que lorsque les symptômes du MCI s'accompagnent de taux élevés de bêta-amyloïde, l'individu

peut être à un stade précoce de la maladie d'Alzheimer. Toutefois, le MCI peut se développer pour des raisons autres que la maladie d'Alzheimer, et cela ne conduit pas toujours à la démence. Chez certaines personnes, le MCI revient à la cognition normale ou reste stable. Dans d'autres cas, comme lorsqu'un médicament provoque une déficience cognitive, le diagnostic du MCI est erroné. Par conséquent, il est important que les personnes ayant une déficience cognitive demandent une aide médicale pour le diagnostic et traitement. Au cours des dernières années, les chercheurs ont commencé à reconnaître l'importance pour les personnes âgées de rapporter leur propre expérience de la mémoire et des problèmes de pensée, sans (ou avant) un examen formel par un médecin. Cette expérience personnelle de problèmes cognitifs est appelée déclin cognitif subjectif. Une raison pour laquelle les chercheurs s'intéressent au déclin cognitif subjectif est que, dans certains cas, cela peut indiquer un stade précoce de la maladie d'Alzheimer. Beaucoup (mais pas toutes) de personnes avec le déclin cognitif subjectif continuent à développer le MCI et la démence.

1.5 Anomalies génétiques associées à la maladie d'Alzheimer

Certaines mutations génétiques et la copie supplémentaire du chromosome 21 qui caractérise le syndrome de Down sont des changements génétiques rares qui affectent le risque d'Alzheimer. Il existe également des variations communes dans les gènes qui affectent le risque d'Alzheimer.

1.5.1 Mutations génétiques

Un faible pourcentage des cas d'Alzheimer (environ 1% ou moins) (Bekris et al., 2010) se développent à la suite de mutations de l'un des trois gènes spécifiques. Une mutation génétique est un changement anormal dans la séquence des paires chimiques qui composent les gènes. Ces mutations impliquent le gène de la protéine précurseur amyloïde (APP) et les gènes des protéines préséniline 1 et préséniline 2. Ceux qui héritent une mutation de la maladie d'Alzheimer aux gènes APP ou préséniline 1 vont développer la maladie. Ceux qui héritent une mutation de la maladie d'Alzheimer au gène de la préséniline 2 ont 95% de chances de développer la maladie (Goldman et al., 2011). Les personnes ayant des mutations d'Alzheimer dans l'un de ces trois gènes ont tendance à développer des symptômes avant l'âge de 65 ans, parfois dès l'âge de 30 ans, alors que la grande majorité des personnes atteintes d'Alzheimer ont une maladie à apparition tardive, dont les symptômes apparaissent à 65 ans ou plus.

1.5.2 Le syndrome de Down

Dans le syndrome de Down, un individu est né avec une copie supplémentaire du chromosome 21, l'un des 23 chromosomes humains. Les scientifiques ne savent pas exactement pourquoi les personnes atteintes du syndrome de Down présentent un risque plus élevé de développer la maladie d'Alzheimer, mais cela pourrait être lié à la copie supplémentaire du chromosome 21. Ce chromosome comprend le gène codant pour la production de l'APP, qui chez les personnes atteintes d'Alzheimer est coupé en fragments bêta-amyloïdes qui s'accumulent en plaques. Avoir une copie supplémentaire du chromosome 21 peut augmenter le nombre de fragments bêta-amyloïdes dans le cerveau. À l'âge de 40 ans, la plupart des personnes atteintes du syndrome de Down ont des taux significatifs de plaques bêta-amyloïdes et d'enchevêtrements de la protéine tau dans leur cerveau (Lott and Dierssen, 2010). Comme chez tous les adultes, l'âge avancé augmente la probabilité qu'une personne atteinte du syndrome de Down présente des symptômes de la maladie d'Alzheimer. Selon "*National Down Syndrome Society, 2017*", environ 30% des personnes trisomiques ayant la cinquantaine souffrent de démence d'Alzheimer. 50% ou plus des personnes atteintes du syndrome de Down développeront la démence d'Alzheimer au cours de leur vie.

1.6 Facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer

À l'exception des cas d'Alzheimer causés par des anomalies génétiques, les experts croient que la maladie d'Alzheimer, comme d'autres maladies chroniques courantes, se développe à la suite de multiples facteurs plutôt que d'une seule cause. Les plus grands facteurs de risque pour la maladie d'Alzheimer tardive sont l'âge avancé (Hebert et al., 2010, 2013), avoir des antécédents familiaux d'Alzheimer (Fratiglioni et al., 1993; Green et al., 2002; Lautenschlager et al., 1996; Mayeux et al., 1991) et porter le gène ApoE-e4 (Farrer et al., 1997; Saunders et al., 1993).

1.6.1 Âge

L'âge est le plus grand de ces trois facteurs de risque, la grande majorité des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer ayant 65 ans ou plus. Le pourcentage de personnes atteintes de démence augmente considérablement avec l'âge : 3% des personnes âgées de 65 à 74 ans, 17% des personnes âgées de 75 à 84 ans et 32% des personnes âgées de 85 ans et plus (Hebert et al., 2013). Il est important de noter que la maladie d'Alzheimer n'est pas une partie

normale du vieillissement, et l'âge avancé seul n'est pas suffisant pour provoquer la démence d'Alzheimer.

1.6.2 Antécédents familiaux

Une histoire familiale d'Alzheimer n'est pas nécessaire pour qu'un individu développe la maladie. Cependant, les personnes qui ont un parent, un frère ou une sœur atteints de la maladie d'Alzheimer sont plus susceptibles de développer la maladie que ceux qui n'ont pas de parent au premier degré atteint de la maladie (Green et al., 2002; Loy et al., 2014). Ceux qui ont plus d'un parent au premier degré avec la maladie d'Alzheimer sont encore plus exposés à un risque (Lautenschlager et al., 1996). Lorsque les maladies surviennent dans les familles, l'hérédité (génétique), les facteurs environnementaux et le mode de vie partagés (par exemple, l'accès à des aliments sains et aux habitudes liées à l'activité physique) peuvent jouer un rôle. Le risque accru associé à l'existence d'antécédents familiaux d'Alzheimer ne s'explique pas entièrement si l'individu a hérité le gène de risque ApoE-e4.

1.6.3 Gène ApoE-e4

Le gène de l'ApoE code une protéine qui contribue à réguler les niveaux et la répartition des lipides dans le corps, l'Apolipoprotéine E (ApoE). De par leur fonction de transporteurs de lipides, les apolipoprotéines E sont essentielles à l'entretien et au remodelage des membranes neuronales sur le site des connexions entre les synapses et les dendrites. 3 versions du gène ont été identifiées, ApoE2 qui semble jouer un rôle protecteur contre la maladie d'Alzheimer et les maladies cardiaques, ApoE3 dont le rôle semble être neutre, et ApoE4 qui accroît le risque des 2 types de maladies (Mahley and Rall, 2000). Cette variante ApoE4 à haut risque, déclenche une réaction inflammatoire qui affaiblit la barrière hémato-encéphalique (Spinney, 2014).

Une méta-analyse comprenant 20 articles publiés décrivant la fréquence de l'allèle e4 chez des personnes aux États-Unis ayant reçu un diagnostic d'Alzheimer a révélé que 56% avaient une copie du gène ApoE-e4 et 11% avaient deux copies de l'ApoE-e4 gène (Ward et al., 2012). Une autre étude a révélé que parmi 1770 personnes diagnostiquées dans 26 centres de la maladie d'Alzheimer à travers les États-Unis, 65% avaient au moins une copie du gène ApoE-e4 (Mayeux et al., 1998). Contrairement à l'hérédité d'une mutation génétique qui cause la maladie d'Alzheimer, hériter le gène ApoE-e4 ne garantit pas qu'un individu développera la maladie d'Alzheimer. Cela est également vrai pour plus de 20 gènes récemment identifiés qui

apparaissent pour affecter le risque de la maladie d'Alzheimer. On pense que ces gènes ont un effet limité sur la prévalence globale de la maladie d'Alzheimer, car ils sont rares ou n'augmentent que légèrement le risque (Chouraki and Seshadri, 2014).

1.7 Facteurs de risque modifiables

Bien que les facteurs de risque tels que l'âge et les antécédents familiaux ne peuvent pas être modifiés, d'autres facteurs de risque peuvent être modifiés pour réduire le risque du déclin cognitif et de démence. Un rapport (Baumgart et al., 2015) évaluant l'état des preuves sur les effets des facteurs de risque modifiables sur le déclin cognitif et la démence a conclu qu'il existe des preuves suffisamment solides, d'un point de vue populationnel, que l'activité physique régulière et la gestion des facteurs de risque cardiovasculaires (en particulier le diabète, l'obésité, le tabagisme et l'hypertension) réduisent le risque du déclin cognitif et peuvent réduire le risque de démence. Il a également conclu qu'il y a suffisamment des preuves solides qu'une alimentation saine et l'apprentissage tout au long de la vie/l'entraînement cognitif peut réduire le risque de déclin cognitif. Un rapport de la National Academy of Medicine (anciennement l'Institute of Medicine) a examiné les preuves concernant les facteurs de risque modifiables pour le déclin cognitif et a atteint des conclusions similaires (Institute of Medicine and Aging, 2015).

1.7.1 Facteurs de risque des maladies cardiovasculaires

La santé du cerveau est affectée par la santé du cœur et des vaisseaux sanguins. Bien qu'il ne représente que 2% du poids corporel, le cerveau consomme 20% des réserves d'oxygène et d'énergie du corps (Mergenthaler et al., 2013). Un cœur en santé veille à ce que suffisamment de sang soit pompé vers le cerveau, tandis que les vaisseaux sanguins sains permettent au sang riche en oxygène et en nutriments d'atteindre le cerveau pour qu'il puisse fonctionner normalement. De nombreux facteurs qui augmentent le risque de maladie cardiovasculaire sont également associés à un risque plus élevé de démence. Ces facteurs comprennent le tabagisme (Anstey et al., 2007; Beydoun et al., 2014; Ohara et al., 2015; Rusanen et al., 2011) et le diabète (Gudala et al., 2013; Reitz et al., 2011; Vagelatos and Eslick, 2013; Wu et al., 2008). Certaines études proposent que le traitement du glucose altéré (un précurseur du diabète) puisse également entraîner un risque accru de démence (Crane et al., 2013; Rönnekaa et al., 2011).

En s'appuyant sur le lien entre la santé du cœur et la santé du cerveau, les chercheurs ont découvert que les facteurs qui protègent le cœur peuvent également protéger le cerveau et réduire le risque de développer la maladie d'Alzheimer ou d'autres démences. L'activité physique semble être l'un de ces facteurs (Tan et al., 2017; Willis et al., 2012). Bien que les chercheurs aient étudié une grande variété d'exercices, ils ne savent pas encore quels types spécifiques d'exercices, quelle fréquence d'exercice ou quelle durée d'activité peut être le plus efficace pour réduire les risques (Blondell et al., 2014; Koščak Tivadar, 2017; Stephen et al., 2017; Willey et al., 2016). En plus de l'activité physique, de nouvelles données suggèrent que la consommation d'un régime sain pour le cœur peut être associée à une réduction du risque de démence (Barberger-Gateau et al., 2007; Hardman et al., 2016). Une alimentation saine pour le cœur met l'accent sur les fruits, les légumes, les grains entiers, le poisson, le poulet, les noix et les légumineuses tout en limitant les gras saturés, la viande rouge et le sucre (Lourida et al., 2013; Morris et al., 2015b). Les chercheurs ont commencé à étudier les combinaisons de facteurs de santé et de comportements (par exemple la tension artérielle et l'activité physique) pour déterminer si les combinaisons de facteurs de risque permettent de mieux identifier le risque de la maladie d'Alzheimer et de la démence que les facteurs de risque individuels (Morris et al., 2015a). Ils étudient également si l'intervention simultanée sur plusieurs facteurs de risque a plus de chance de réduire le risque que d'aborder un seul facteur de risque (Ngandu et al., 2015).

1.7.2 Éducation

Les personnes ayant plus d'années d'éducation formelle sont à risque plus faible pour la maladie d'Alzheimer et d'autres démences que ceux ayant moins d'années d'éducation (Fitzpatrick et al., 2004; Kukull et al., 2002). Certains chercheurs croient que le fait d'avoir plus d'années d'éducation crée une «réserve cognitive» (Stern, 2012). La réserve cognitive fait référence à la capacité du cerveau à faire un usage flexible et efficace des réseaux cognitifs (réseaux de connexions neurone-neurone), pour permettre à une personne de continuer à effectuer des tâches cognitives malgré des altérations cérébrales préjudiciables (Stern, 2002), telles que l'accumulation de bêta-amyloïde et de tau. Le nombre d'années d'éducation formelle n'est pas le seul déterminant de la réserve cognitive. Avoir un travail stimulant mentalement et s'engager dans d'autres activités stimulantes peut aussi aider à construire une réserve cognitive (Evans et al., 2003).

Certains scientifiques croient que des facteurs autres que le nombre d'années d'éducation formelle peuvent contribuer ou expliquer le risque accru de démence chez les personnes ayant moins d'années d'éducation formelle. Ces facteurs comprennent une probabilité accrue d'avoir des occupations moins stimulantes sur le plan mental (Grzywacz et al., 2016; Pool et al., 2016; Then et al., 2014). De plus, avoir moins d'années d'éducation formelle est associé à un statut socioéconomique inférieur (McDowell et al., 2007), ce qui peut à son tour augmenter la probabilité de souffrir d'une mauvaise alimentation et de diminuer sa capacité à se payer des soins de santé ou des traitements médicaux, tels que des traitements pour les facteurs de risque cardiovasculaires. Enfin, aux États-Unis, les personnes ayant moins d'années d'études tendent à avoir plus de facteurs de risque cardiovasculaire pour la maladie d'Alzheimer, notamment être moins actives (Harris et al., 2013) et présenter un risque plus élevé de diabète et de maladies cardiovasculaires (Steptoe et al., 2005).

1.7.3 Engagement social et cognitif

Des études supplémentaires suggèrent que rester socialement et mentalement actif tout au long de la vie peut soutenir la santé du cerveau et éventuellement réduire le risque de la maladie d'Alzheimer et d'autres formes de démence (Saczynski et al., 2006; Wang et al., 2002, 2012a). Rester socialement et mentalement actif peut aider à construire la réserve cognitive, mais le mécanisme exact par lequel cela peut se produire est inconnu. Des recherches approfondies sont nécessaires pour mieux comprendre comment l'engagement social et cognitif peut affecter les processus biologiques pour réduire les risques (Di Marco et al., 2014; Karp et al., 2006).

1.8 Traitements de la démence d'Alzheimer

1.8.1 Traitements pharmacologiques

Aucun des traitements pharmacologiques disponibles aujourd'hui pour la démence d'Alzheimer ne ralentit ou n'arrête les dommages et la destruction des neurones qui causent les symptômes de la maladie d'Alzheimer et rendent la maladie fatale. La « FDA » (*Food and Drug Administration* américaine) a approuvé six médicaments pour le traitement de la maladie d'Alzheimer : la Rivastigmine, la Galantamine, le Donépézil, la Mémantine, la Mémantine associée au donépézil et de la Tacrine (la Tacrine est maintenant abandonnée aux États-Unis). Ces médicaments améliorent temporairement les symptômes en augmentant la

quantité de produits chimiques appelés neurotransmetteurs dans le cerveau. L'efficacité de ces médicaments varie d'une personne à l'autre. Au cours de la décennie 2002-2012, 244 médicaments pour la maladie d'Alzheimer ont été testés dans des essais cliniques enregistrés par clinicaltrials.gov, un registre des instituts nationaux des études cliniques financées par des fonds publics et privés (Cummings et al., 2014). Un seul des 244 médicaments (Mémantine) a complété avec succès les essais cliniques et a reçu l'approbation de la FDA. De nombreux facteurs contribuent à la difficulté de développer des traitements efficaces pour la maladie d'Alzheimer. Ces facteurs incluent l'incapacité des modèles animaux à prédire de manière fiable si un traitement expérimental sera efficace chez les humains, la lenteur du recrutement des études cliniques et le temps relativement long nécessaire pour observer si un traitement expérimental affecte la progression de la maladie.

1.8.2 Thérapies non pharmacologiques

Les thérapies non pharmacologiques sont celles qui n'impliquent pas de médicaments. Les thérapies non pharmacologiques sont souvent utilisées dans le but de maintenir ou d'améliorer la fonction cognitive, la capacité d'effectuer des activités de la vie quotidienne ou la qualité de vie globale. Elles peuvent également être utilisées dans le but de réduire les symptômes comportementaux tels que la dépression, l'apathie, l'errance, les troubles du sommeil, l'agitation et l'agression. Les exemples incluent la formation de la mémoire informatisée, l'écoute de la musique préférée comme un moyen de remuer le rappel, et l'incorporation d'un éclairage spécial pour réduire les troubles du sommeil. Comme pour les thérapies pharmacologiques actuelles, les thérapies non pharmacologiques ne ralentissent ni n'arrêtent les dommages et la destruction des neurones qui causent les symptômes de la maladie d'Alzheimer et rendent la maladie fatale. Des revues et des méta-analyses de thérapies non pharmacologiques testées dans des essais contrôlés randomisés ont montré que certaines sont bénéfiques aux personnes atteintes de démence d'Alzheimer. Parmi ceux-ci sont l'exercice (Farina et al., 2014; Groot et al., 2016) et la stimulation cognitive (Aguirre et al., 2013). Plus précisément, une méta-analyse a révélé que l'exercice aérobique et une combinaison d'exercices aérobiques et non aérobiques avaient des effets positifs sur la fonction cognitive (Groot et al., 2016), tandis qu'une revue systématique a révélé que l'exercice a un effet positif sur la fonction cognitive globale et peut avoir un effet positif sur le taux de déclin cognitif chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer. Cependant, les chercheurs mettent en garde que d'autres essais contrôlés randomisés impliquant un plus grand nombre de

participants sont nécessaires pour comprendre dans quelle mesure l'exercice peut ralentir le déclin cognitif. Une deuxième revue systématique a montré que la stimulation cognitive avait des effets bénéfiques sur la fonction cognitive et certains aspects du bien-être (Aguirre et al., 2013). La stimulation cognitive allait des activités de catégorisation des objets aux exercices d'orientation de la réalité. Aucun type de stimulation cognitive n'a été identifié comme étant plus efficace qu'un autre. Les avantages de la fonction cognitive ont duré jusqu'à trois mois après la fin des activités de stimulation cognitive. La stimulation cognitive n'a pas eu d'effet sur l'humeur, les comportements difficiles ou la capacité d'effectuer des activités de la vie quotidienne.

1.8.3 Vivre avec la démence d'Alzheimer

Malgré le manque de thérapies qui ralentissent ou arrêtent la maladie d'Alzheimer, des études ont constamment montré que la gestion active de la maladie d'Alzheimer et d'autres démences peut améliorer la qualité de vie des personnes touchées (Grossberg et al., 2010; Vickrey et al., 2006; Voisin and Vellas, 2009). La gestion active comprend :

- Utilisation appropriée des options de traitement disponibles.
- Gestion efficace des conditions coexistantes.
- Coordination des soins entre les médecins, les autres professionnels de la santé et les aidants non professionnels.
- Participer à des activités significatives et apporter un sens à sa vie.
- Avoir des occasions de se connecter avec d'autres personnes vivant avec la démence ; les groupes de soutien et les services de soutien sont des exemples de telles opportunités.
- Devenir éduqué sur la maladie.
- Planifier pour le futur.

1.9 Histopathologie

Après la mort d'Auguste Deter en 1906, Alois Alzheimer a effectué une étude histopathologique post-mortem de son cerveau en appliquant des techniques de coloration histologique disponibles à l'époque. Il a été le premier à décrire les plaques amyloïdes caractéristiques et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF), qui, même aujourd'hui, sont

utilisés comme signature neuropathologique de la maladie. Le cas a été rapporté sous la forme d'une conférence en 1906 et une publication suivie en 1907 (Alzheimer et al., 1995).

1.9.1 Les plaques séniles

Les plaques séniles (appelées aussi plaques amyloïdes) sont des dépôts extracellulaires sphériques toxiques souvent entourées de neurites dystrophiques, de microglies activées et d'astrocytes réactifs. Le principal composant protéique du noyau des plaques séniles est la protéine β -amyloïde ($A\beta$), un peptide de 39 ± 43 acides aminés dérivé du précurseur de la protéine β -amyloïde (APP), une glycoprotéine transmembranaire exprimée de façon omniprésente (Glennner and Wong, 1984; Kang et al., 1987).

Les peptides $A\beta$ sont produits par clivage de l'APP selon la voie amyloïdogénique par une β -sécrétase au site N-terminal du domaine $A\beta$, suivie par son clivage par une γ -sécrétase à l'extrémité C-terminale, générant ainsi des fragments $A\beta$ de longueurs diverses et un fragment (AICD) (Fig. 3). Le peptide le plus long, $A\beta_{1-42}$, est plus neurotoxique et plus enclin à l'agrégation (Vassar and Citron, 2000). La voie non amyloïdogénique implique le clivage de l'APP par l' α -sécrétase dans la séquence de l' $A\beta$ prévenant ainsi la production du peptide neurotoxique $A\beta$.

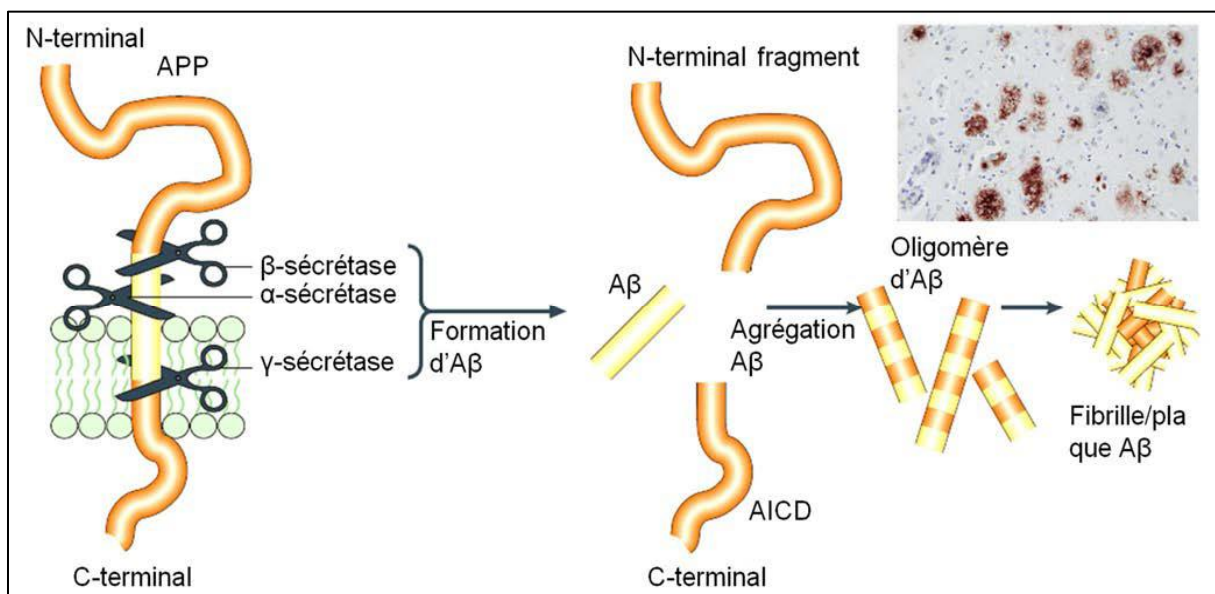


Fig. 3. Représentation schématique du métabolisme du précurseur de la protéine β -amyloïde (APP) selon la voie amyloïdogénique. Figure adaptée de (Götz and Ittner, 2008; Wirths et al., 2010).

1.9.2 Les dégénérescences neurofibrillaires

Les enchevêtrements neurofibrillaires se forment à l'intérieur des neurones et consistent en des filaments de 20 nm qui sont des rubans torsadés. Deux filaments enroulés l'un autour de l'autre. Ces filaments sont composés principalement de formes hyperphosphorylées de tau, la protéine du cytosquelette, connue pour stabiliser les microtubules présents principalement dans les processus axonaux et impliqués dans le transport axonal des composants subcellulaires. La phosphorylation anormale de cette protéine liée aux microtubules conduit à des structures protéiques moléculaires appelées filaments hélicoïdaux appariés (Fig. 4), qui constituent le noyau ultrastructural des structures microscopiques reconnues comme dégénérescences neurofibrillaires (Goedert et al., 1988; Grundke-Iqbal et al., 1986).

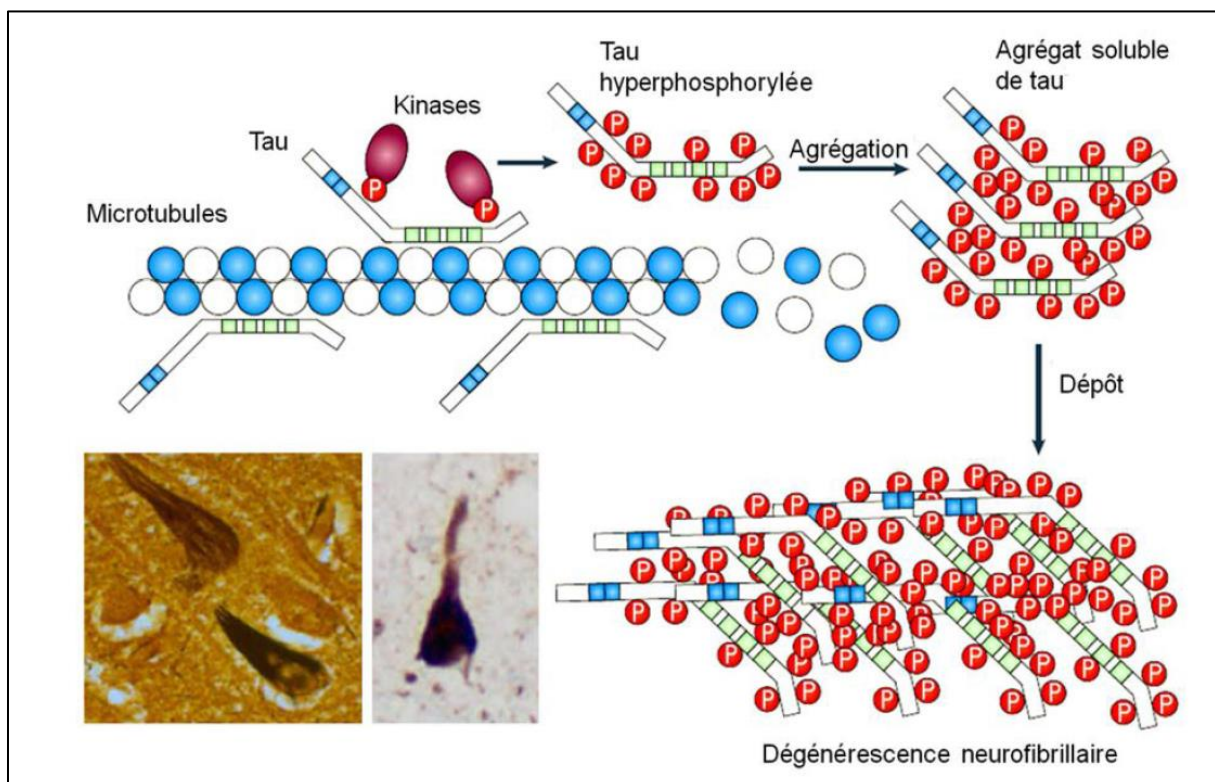


Fig. 4. La protéine tau et ses différents états d'agrégation. (Adaptée de Götz and Ittner, 2008; Santa-Maria et al., 2012).

1.9.3 L'hypothèse amyloïde

La controverse concernant la cause moléculaire principale de la maladie d'Alzheimer persiste encore aujourd'hui. Actuellement, la théorie prédominante est que l'accumulation anormale de peptides A β provoque la cascade pathologique complexe qui définit la MA. Cette théorie est appelée Hypothèse amyloïde et a été défendue par un certain

nombre d'investigateurs très influents tels que Dennis Selkoe, John Hardy, Colin Masters, Konrad Beyreuther et Blas Frangione (Hardy, 2006; Selkoe, 2003).

Une grande partie de la pensée initiale était centrée autour de la charge amyloïde et de la nature des dépôts du système nerveux central (SNC) formant les plaques caractéristiques. Le matériel amyloïde a été initialement considéré comme dérivé de protéines sériques et caractérisé comme un peptide court (Glennner and Wong, 1984; Wong et al., 1985) dont la séquence a été rapidement confirmée par Masters et Beyreuther (Masters et al., 1985).

Ces principes de base ont fourni une plate-forme appropriée pour la théorie actuelle selon laquelle un dysmétabolisme d'A β est un aspect causal central dans la pathologie d'Alzheimer. Nous savons, de nos jours, que les peptides A β sont produits à la suite du clivage de l'APP logé dans les membranes cellulaires (Fig. 3). La libération de peptides A β à partir de membranes est obtenue par l'action consécutive de la β - et γ -sécrétases sur l'APP. L'hypothèse amyloïde est basée sur plusieurs observations :

Les personnes atteintes du syndrome de Down qui ont trois copies du chromosome 21 portant le gène APP au lieu des deux normales, développent invariablement des plaques amyloïdes avant l'âge de 40 ans conduisant ainsi à des formes familiales de la MA à la suite de la mutation des gènes du métabolisme de l'APP. La toxicité neuronale induite ainsi par L'A β peut être inhibée par un traitement anti-amyloïde (Finder and Glockshuber, 2007).

Des mutations dans le gène codant la protéine tau provoquent une démence fronto-temporale avec parkinsonisme (Hutton et al., 1998; Poorkaj et al., 1998; Spillantini and Goedert, 1998). Ce trouble neurodégénératif est caractérisé par un dépôt sévère de la protéine tau dans les enchevêtrements neurofibrillaires dans le cerveau, mais aucun dépôt d'amyloïde. L'implication évidente est que même les conséquences les plus graves de l'altération tau - la formation profonde des enchevêtrements neurofibrillaires entraînant une neurodégénérescence fatale - ne sont pas suffisantes pour induire les plaques amyloïdes caractéristiques de la MA. Ainsi, les enchevêtrements neurofibrillaires observés sont susceptibles d'avoir été déposés après des changements dans le métabolisme de l'A β et la formation initiale de plaques, plutôt qu'avant (Hardy et al., 1998).

Les souris transgéniques surexprimant à la fois l'APP humaine mutante et la protéine tau humaine mutante subissent une formation accrue d'enchevêtrements tau-positifs (comparativement aux souris surexprimant la protéine tau seule), alors que la structure et le nombre de leurs plaques amyloïdes sont essentiellement non altérés (Lewis et al., 2001). Cette

découverte suggère que l'altération de l'APP survient avant altérations tau dans la cascade pathogène de la MA, une notion renforcée par l'observation récente que dans les cultures de neurones primaires de l'hippocampe de souris, la toxicité de A β dépend de tau (Rapoport et al., 2002).

Le croisement de souris transgéniques APP avec des souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE) réduit nettement le dépôt cérébral d'A β chez la progéniture (Bales et al., 1997), fournissant des preuves solides que le rôle pathogène de la variabilité génétique au locus de l'ApoE humain (Corder et al., 1993) est très susceptible d'impliquer le métabolisme de l'A β .

Tous ces résultats sont compatibles avec la notion que l'accumulation cérébrale d'A β constitue l'influence primaire dans la MA. Cette accumulation anormale déclenche les processus physiopathologiques suivants : la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires, l'oxydation et la peroxydation lipidique, l'excitotoxicité glutamatergique, l'inflammation et l'activation de la cascade de mort cellulaire apoptotique qui sont considérés comme des conséquences secondaires de la génération et du dépôt de l'A β (Fig. 5).

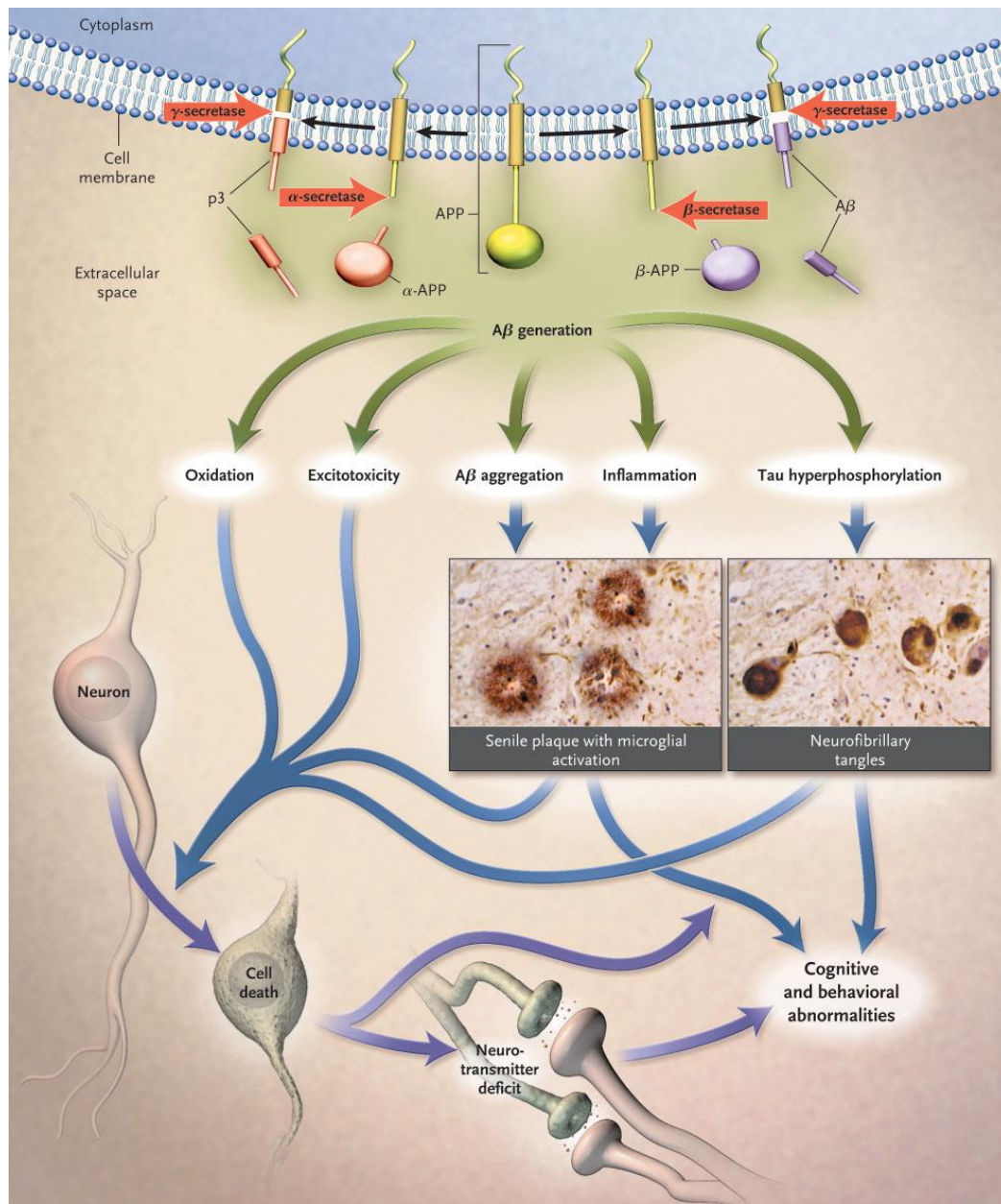


Fig. 5. Hypothèse de la cascade amyloïde, qui progresse de la génération du peptide bêta-amyloïde à partir de la protéine précurseur amyloïde, en passant par plusieurs étapes secondaires jusqu'à la mort cellulaire (Cummins, 2004).

2 LA MEDECINE TRADITIONNELLE

2.1 Généralités

La médecine traditionnelle chinoise (MTC) a une histoire d'utilisation humaine de 3000 ans. Les plantes sont utilisées par tous les groupes ethniques dans les pratiques traditionnelles de la médecine chinoise, avec l'espoir de promouvoir la santé et de gérer diverses maladies telles que la douleur, le rhume, l'inflammation, les maladies cardiaques et neurodégénératives. La caractéristique des plantes médicinales est leur capacité à générer un grand nombre de métabolites secondaires, des substances aromatiques et des microorganismes. Une approche ethnopharmacologique a permis d'identifier de nouveaux médicaments potentiels à partir de sources végétales, indiquant un potentiel d'utilisation thérapeutique grâce à leur richesse en actifs (Sahoo et al., 2010). Les produits à base de plantes sont intéressants pour de nombreux patients et praticiens de la santé, car environ 70% de la population mondiale utilise des médicaments à base de plantes pour une partie de leurs soins de santé primaires (Wills et al., 2000). À ce jour, il existe plus de 11 000 espèces de plantes médicinales utilisées dans le monde et environ 300 espèces sont couramment utilisées dans les pays asiatiques et dans d'autres pays.

La plupart des prescriptions de médecine chinoise contiennent plus d'une plante médicinale pour former une concoction multi-éléments. Lorsque les médicaments sont prescrits, les principes d'interactions entre les herbes doivent être pris en considération par les cliniciens afin de composer une prescription optimale pour les bénéfices thérapeutiques. Le concept d'interaction herbe-herbe, basé sur les notions de positif (complémentation) ou négatif (antagonisme), a donc été développé. Au début de l'histoire de l'utilisation des agents médicinaux, on s'est rendu compte que la présence d'une herbe peut modifier l'effet de l'autre lorsqu'elles sont co-administrées. L'effet combiné, complémentaire ou antagoniste, se manifesterait dans le résultat clinique (Xie, 2000).

2.2 Mode d'action des plantes

Bien que les mécanismes d'action soient généralement inconnus, les produits à base d'herbes sont utilisés dans différentes régions et cultures, comme herbe unique, combinaison d'herbes, ou combinaison d'herbes et de médicaments. Lorsque les herbes sont utilisées en combinaison, les effets peuvent être compliqués car diverses interactions peuvent se produire

entre les composants individuels. Les interactions les plus souhaitables sont celles qui peuvent entraîner un bénéfice thérapeutique supplémentaire. C'est souvent le résultat escompté ou attendu lors de l'utilisation de la polythérapie. Cependant, en raison de la présence de plusieurs composants dans les produits à base de plantes, les effets découlant des interactions plantes-herbes ou herbes-médicaments sont souvent imprévisibles et compliqués. Les prescriptions multi-items sont formulées délibérément selon six modes de base d'interactions herbe-herbe ; à savoir, le renforcement, la potentialisation, la contention, la détoxification, la neutralisation et la toxicité. Ils servent de principes directeurs lorsque des concoctions multi-articles sont prescrites afin d'améliorer l'utilisation sûre et efficace des herbes.

2.2.1 Renforcement

Le renforcement fait référence à des situations dans lesquelles des herbes possédant des propriétés médicinales similaires sont utilisées ensemble pour produire une plus grande efficacité. Prenant comme exemple la décoction d'éphédra et la brindille de cannelle qui forment une paire d'agents diaphorétiques ; l'effet adrénérgique (sudation) du premier est renforcé par le second par une augmentation du débit sanguin périphérique. En conséquence, l'effet fébrifuge est amélioré. D'un point de vue pharmacologique moderne, le renforcement peut probablement être interprété comme incluant soit un effet additif (lorsque l'effet combiné de deux herbes est égal à la somme des effets de chaque agent seul), soit un effet synergique (lorsque l'effet combiné dépasse la somme des effets des herbes individuelles) (Thompson et al., 2012).

2.2.2 Potentialisation

La potentialisation se réfère à des situations où deux herbes sont utilisées dans la même prescription, dans laquelle l'une d'eux sert d'herbe principale et l'autre une herbe auxiliaire dont le rôle est d'aider à renforcer l'effet de l'herbe principale. Un exemple est la combinaison de racine de ginseng et de racine d'aconite (*Aconitum carmichaelii*) dans un remède anti-choc. Dans la formule, le ginseng est le composant principal pour renforcer le *qi* primaire (énergie et vitalité) afin de réanimer, alors que l'aconite aide à «réchauffer» le corps et à élever l'énergie *yang*. En travaillant ensemble, ils sont capables de reconstituer la vitalité innée et postnatale dans le corps et de restaurer les fonctions physiologiques vitales, en particulier pendant l'état d'urgence d'effondrement et de choc (Xie, 2000). Une étude récente dans un modèle de douleur neuropathique de rat a démontré l'effet synergique d'une combinaison de glycosides de paeony et de flavonoïdes de réglisse dans le rapport de 3:1 (Zhang et al., 2013). Dans la médecine moderne, un concept similaire de potentialisation a été développé pour faire

usage d'agents pharmaco-améliorants (ou soi-disant «booster») dans les régimes anti-VIH (Guiguet et al., 2012), dans lesquels le *booster-Drug* interagit avec le médicament antiviral pharmacocinétique pour ralentir le métabolisme hépatique de ce dernier par les enzymes hépatiques, augmentant ainsi la concentration du médicament actif dans le sang pour améliorer et prolonger l'effet thérapeutique.

2.2.3 Retenue et désintoxication

En médecine Chinoise, de nombreuses herbes sont considérées comme possédant des propriétés toxiques. Le concept de toxicité fait référence à différents degrés d'effets indésirables, mais pas nécessairement de fatalité. Par conséquent, l'utilisation de ce qu'on appelle des "herbes toxiques" à des fins thérapeutiques est acceptable ou même souhaitable dans certains cas (Wang et al., 2012b). La combinaison d'une herbe toxique avec une autre herbe non toxique est parfois considérée comme un moyen de rendre l'effet toxique plus tolérable. L'utilisation combinée du tubercule de gingembre et de pinellia (*Pinellia ternata*) est un exemple de l'effet de "retenue" et de "désintoxication". Le tubercule de Pinellia est considéré comme une plante toxique qui causerait une irritation grave des muqueuses et une inflammation de la gorge et du tractus gastro-intestinal. Il a été suggéré que l'oxalate de calcium et l'agglutinine sont les principes toxiques responsables des réponses inflammatoires (Zhong et al., 2006; Zhu et al., 2012). Afin de réduire la toxicité de la pinelline (sans compromettre son effet thérapeutique), elle est souvent cuite avec du gingembre. En fait, une étude chez l'animal a montré que le gingembre pouvait réduire l'incidence de la torsion abdominale chez les souris après l'injection intra-péritonéale de pinellules; il a également supprimé la perméabilité capillaire dans la cavité abdominale ainsi que la réduction des teneurs en prostaglandine E2 dans le tissu inflammatoire des pieds des souris après l'injection de la pinellaire (Wu et al., 1998). Alors que le mécanisme exact de l'action détoxifiante entre les herbes est inconnu, on peut supposer qu'il peut y avoir une altération de la solubilité des ingrédients chimiques, ralentissant l'absorption des ingrédients toxiques, et/ou des changements structuraux des ingrédients toxiques. L'utilité principale de ce mode d'interaction est donc d'utiliser l'herbe partenaire pour limiter l'effet toxique, mais sans affecter l'action thérapeutique principale de l'herbe toxique.

2.2.4 Neutralisation

La contre-action fait référence à des situations dans lesquelles l'effet thérapeutique d'une plante est diminué par une autre plante. Cela peut être interprété comme une interaction antagoniste, bien que dans la médecine traditionnelle Chinoise, le concept d'antagonisme

physique, chimique, dispositionnel ou récepteur est absent. Un exemple bien connu de contre-action est l'interaction entre racine de navet/graine et racine de ginseng. Le ginseng est souvent utilisé comme médicament tonique pour élever l'énergie vitale, mais lorsqu'il est utilisé en présence de navet, son effet tonifiant serait grandement réduit ou même éliminé. Il est intéressant de noter qu'une telle réaction a été observée dans une étude récente qui a trouvé que le jus de navet pouvait abolir l'effet génoprotecteur du ginseng (Szeto et al., 2011). Bien que le mécanisme exact demeure inconnu, la connaissance de la contre-action d'herbe-herbe peut servir de guide pour la pratique chinoise de pharmacie de fines herbes quand des combinaisons d'herbes sont prescrites.

2.2.5 Incompatibilité

Une autre interaction herbe-herbe conduisant à un résultat défavorable est la situation dans laquelle une combinaison entraînerait des effets indésirables toxiques ou graves, c'est-à-dire que les herbes sont mutuellement incompatibles et devraient donc être évitées dans toutes les prescriptions. Alors que les mécanismes pharmacologiques exacts de ces interactions ne sont pas clairement compris, on a observé que la racine de ginseng supprime l'activité enzymatique et l'expression de l'ARNm des isoenzymes du CYP450 en présence de la racine de *Veratrum nigrum* (Wang et al., 2004). D'autres études peuvent offrir un aperçu du mode possible d'interaction clinique dans le futur.

2.3 Médecine traditionnelle Chinoise et maladie d'Alzheimer

Dans les pratiques traditionnelles de la médecine Chinoise, de nombreuses plantes ont été utilisées pour améliorer la fonction cognitive et pour soulager d'autres symptômes associés à la MA. Ainsi, les plantes réputées avoir des effets «améliorant la mémoire» pourraient également être considérées pour leur efficacité potentielle dans des troubles maintenant reconnus comme étant associés à un dysfonctionnement cognitif, y compris des états qui présentent une démence. De nombreux médicaments actuellement disponibles en médecine occidentale étaient à l'origine isolés à partir de plantes, ou sont dérivés de matrices de composés isolés à partir de plantes. La galantamine, isolée à partir de plusieurs plantes dont le *Lycoris radiata*, qui était utilisé en médecine traditionnelle chinoise (MTC), est homologué au Royaume-Uni pour le traitement de la MA légère à modérée. Diverses autres espèces végétales ont montré des activités pharmacologiques pertinentes pour le traitement des troubles cognitifs, indiquant un potentiel d'utilisation thérapeutique dans des troubles tels que

la MA (Howes and Houghton, 2003). Le tableau 1 regroupe les 10 plantes de la MTC les plus fréquemment utilisées dans le cadre des maladies cognitives.

Tableau 1. Plantes de la MTC utilisées dans le cadre des maladies cognitives.

Nom Chinois	Nom Anglais	Nom Latin
Fu Ling	Poria	<i>Poria cocos</i>
Ren Shen	Ginseng	<i>Radix et rhizoma ginseng</i>
Yuan Zhi	Thinleaf milkwort	<i>Radix polygalae</i>
Gan Cao	Licorice	<i>Radix et rhizoma glycyrrhizae</i>
Dang Gui	Chinese Angelica	<i>Radix Angelica sinensis</i>
Shi Chang Pu	Grassleaf sweeflag rhizome	<i>Rhizoma acori tatarinowii</i>
Suan Zao Ren	Spina date seed	<i>Semen ziziphi spinosae</i>
Shu Di Huang	Prepared rehmannia root	<i>Radix rehmanniae</i>
Mai Dong	Dwarf lilyturf tuber	<i>Radix ophiopogonis</i>
Sheng Jiang	Fresh ginger	<i>Rhizoma zingiberis</i>

(Source : Pharmacopée Chinoise 2005).

2.4 SuHeXiang Wan

SuHeXiang Wan (SHXW), une prescription médicinale traditionnelle Chinoise (pilule Storax), se compose de 15 herbes brutes. Cette prescription a été utilisée par voie orale pour le traitement de convulsions, convulsions infantiles, Qi déprimé (esprit ou vitalité générale), perte soudaine de conscience, accident vasculaire cérébral et d'autres indications (Bensky et al., 1986). L'huile essentielle modifiée SHXW présente des propriétés sédative, anticonvulsivante et antioxydante (Koo et al., 2004).

Chez la souris, la pré-inhalation de l'huile essentielle de SHXW a montré une amélioration de la dégradation de la mémoire induite par $A\beta_{1-42}$ et une suppression de la phosphorylation de JNK, p38 et Tau dans l'hippocampe. L'huile essentielle de SHXW atténue l'apoptose induite par l' $A\beta$ et la production de ROS via une régulation à la hausse de l'expression de HO-1 et Nrf2 dans les cellules de neuroblastome SH-SY5Y (Jeon et al., 2011).

2.4.1 *Liquidambar orientalis*

Le *Liquidambar orientalis*, est un arbre de la famille des *Hamamelidaceae*, ou des *Altingiaceae* selon la classification phylogénétique, communément connu sous le nom « oriental sweetgum » (Park, 2014), est un arbre à feuilles caduques du genre *Liquidambar*, originaire de la région de la Méditerranée orientale, qui se produit principalement dans les plaines inondables du sud-ouest de la Turquie et sur l'île grecque de Rhodes (Fig. 6).



Fig. 6. *Liquidambar orientalis*.



Fig. 7. Résine du *Liquidambar orientalis*.

2.4.1.1 Propriétés

La plupart des propriétés médicinales du sweetgum proviennent de la sève résineuse qui se dégage lorsque l'écorce externe de l'arbre est endommagée. La sève (Fig. 7), connue sous le nom de storax, a été utilisée pendant des siècles pour traiter les affections courantes telles que les problèmes de peau, la toux et les ulcères. Plus récemment, le storax s'est avéré être un fort agent antimicrobien même contre des bactéries multirésistantes telles que *Staphylococcus aureus* (Sagdic et al., 2005). D'autres extraits dérivés de Sweetgum montrent des effets antioxydants, anti-inflammatoires, chimio-préventifs et anticonvulsivants (Saraç & Şen, 2014b) (Guo et al., 2011) . Les extraits de sève possèdent une activité antifongique contre divers champignons phytopathogènes et ont été des traitements efficaces pour réduire les nématodes et le moustique jaune (Lingbeck et al., 2015).

2.4.1.2 Principaux constituants

Les arbres de Sweetgum sont des ressources importantes pour les composés médicinaux et autres composés bénéfiques. Les composés phénoliques majoritaires du liquidambar orientalis sont : l'acide gallique, l'acide protocatéchique, la catéchine, l'acide caféique, la quercétine et l'acide férulique (Saraç & Şen, 2014a).

2.4.2 *Aquilaria agallocha*

L'*Aquilaria* est une espèce de plantes aromatiques qui est communément appelé «bois Gaharu» en Asie du Sud-Est (Takemoto et al., 2008). Elle se trouve principalement en Malaisie, Indonésie, Inde, Iran, Singapour, Bangladesh, Myanmar, Philippines et en Thaïlande (Oldfield, 1998) (Fig. 8). L'*Aquilaria Agallocha* (*Malaccensis*) produit une précieuse résine marinée dans le bois de cœur. Cette résine provient du fait de la réponse immunitaire naturelle aux attaques fongiques (Fig. 9).

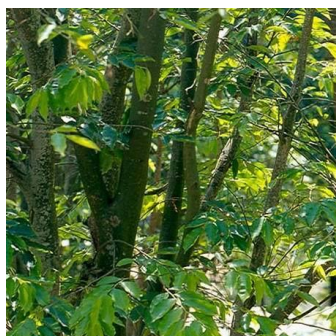


Fig. 8. *Aquilaria agallocha*.



Fig. 9. Bois de cœur de l'*Aquilaria agallocha*.

2.4.2.1 Propriétés

L'endophyte est un champignon qui vit à l'intérieur des tissus végétaux sains de l'*Aquilaria*, certains de ces endophytes ont été trouvés à avoir des propriétés antibactériennes (Shoeb et al., 2010). L'huile essentielle de l'*Aquilaria agallocha* est facile à produire et couramment utilisée en médecine traditionnelle pour soulager la douleur, la fièvre, les rhumatismes et l'asthme (Huda et al., 2009). L'huile d'*Aquilaria agallocha* possède une forte activité cytotoxique vis-à-vis des cellules cancéreuses du côlon humain et peut donc être un bon candidat pour le traitement du cancer (Ibrahim et al., 2011). L'extrait aqueux de tiges d'*Aquilaria agallocha* contribue de manière importante au traitement de l'anaphylaxie et peut être utile pour d'autres maladies allergiques (Kim et al., 1997). L'extrait à l'hexane des feuilles de l'*Aquilaria agallocha* possède un fort pouvoir antioxydant (Huda et al., 2009).

2.4.2.2 Principaux constituants

Un certain nombre de composés ont été extraits à partir de l'*Aquilaria agallocha* tels que des alcaloïdes, des tanins, des saponines, des triterpénoïdes, des glycosides et des Quinones (Dash et al., 2008).

2.4.3 *Boswellia carteri*

Le *Boswellia carteri* communément appelé l'olibanum est un petit arbre à feuilles caduques de la famille des Burseraceae (Fig. 10). C'est l'arbre primaire du genre *Boswellia* dont on récolte l'encens, une sève séchée résineuse qui est connu sous le nom de l'oliban (Fig. 11). Il est originaire de la péninsule arabique (Oman, Yémen) et de l'Afrique du Nord-Est (Somalie) (Culioli, 2003; Thulin and Warfa, 1987).



Fig. 10. *Boswellia carteri*.



Fig. 11. Oliban du Yémen.

2.4.3.1 Propriétés

La résine du *Boswellia carteri*, est l'une des plus anciennes résines parfumées et médicinales connues dans le monde entier (Coppens, 1995). Elle a été utilisée dans la médecine traditionnelle Ayurvédique pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde et d'autres maladies inflammatoires dans de nombreux pays (Safayhi et al., 1997). Elle présente également une activité contre les cellules tumorales et des effets chimio-préventifs (Glaser et al., 1999; Zhao et al., 2003).

2.4.3.2 Principaux constituants

Les principaux composants actifs de la résine du *Boswellia carteri* sont les acides boswelliques appartenant aux triterpènes pentacycliques de type ursane et oléanane (Safayhi and Sailer, 1997; Safayhi et al., 1992; Singh and Atal, 1986).

2.4.4 *Santalum album*

Le *Santalum album*, également connu sous le nom de bois de santal, est un arbre de taille moyenne qui pousse à 8-12 m de hauteur et 2,5 m de circonférence (Grieve and Leyel, 1973). Il est principalement cultivé dans le sud de l'Inde, au Sri Lanka, en Australie et dans l'archipel malais (Burdock and Carabin, 2008) (Fig. 12).



Fig. 12. *Santalum album*.



Fig. 13. Bois de cœur du *Santalum album*.

2.4.4.1 Propriétés

C'est un arbre économiquement important en raison de son bois de cœur et de son huile essentielle utilisée en parfumerie, médecine, cosmétique et aussi dans les industries « Agarbathi » (bâtonnets d'encens) (Srinivasan et al., 1992) (Fig. 13). La matière volatile obtenue par distillation à la vapeur d'eau du bois de cœur du *Santalum album* est appelée huile de bois de santal et est utilisée en aromathérapie (Burdock and Carabin, 2008).

L'huile de bois de santal possède plusieurs activités biologiques intéressantes comme antivirale, antimicrobienne, anticancéreuse et antigestive (Dwivedi et al., 2006; Jenssen et al., 2006; Koch et al., 2008). Elle constitue également un puissant inhibiteur de la tyrosinase et de la cholinestérase (Misra and Dey, 2012, 2013).

2.4.4.2 Principaux constituants

L'extrait du bois de santal contient une variété de composés aromatiques (Kim et al., 2005a; Matsuo and Mimaki, 2010) et des sesquiterpènes (Kim et al., 2005b, 2006; Ochi et al., 2005). Deux sesquiterpénols (α - et β -santalol) sont les principaux composants de cette huile essentielle, dont l'isomère alpha, un sesquiterpène tricyclique volatil est prédominant (Dwivedi et al., 2006; Kaur et al., 2005; Ohmori et al., 2007; Zhang et al., 2010). La valeur commerciale de l'huile essentielle dépend de la teneur en santalols. Les huiles provenant du bois présentent des pourcentages plus élevés en santalols, tandis que celles produites par les branches et les feuilles contiennent des niveaux plus élevés de farnésol et du bisabolol (Erligmann, 2001).

2.4.5 *Styrax benzoin*

Le *Styrax benzoin* est une espèce d'arbre originaire de Sumatra en Indonésie appartenant à la famille des *Styracaceae* (Fig. 14). Cet arbre produit une résine balsamique (benjoin), un

produit pathologique qui sort de la tige lorsque de profondes entailles sont faites dans l'écorce (Coppen, 1999) (Fig. 15).



Fig. 14. *Styrox benzoin*.



Fig. 15. Résine du styrox (benjoin).

2.4.5.1 Propriétés

Le benjoin de Sumatra est largement utilisé en Asie, non seulement pour la cicatrisation des plaies, l'érythème et la toux, mais aussi pour les rites religieux. Il est souvent utilisé dans les parfums de savon et de détergent grâce à ses propriétés fixatrices, ainsi que dans les arômes de type chocolat auxquels il apporte des notes chaudes et épicées intéressantes (Coppen, 1999; Fernandez et al., 2003).

2.4.5.2 Principaux constituants

Les principaux composants du benjoin de Sumatra sont le benzoate de benzyle, l'acide cinnamique, le cinnamate de benzyle, le styrène, l'acide benzoïque, le benzoate de cinnamyle, le benzoate d'allyle, le benzaldéhyde et le benzoate de méthyle (Fernandez et al., 2003).

2.4.6 *Eugenia caryophyllata*

L'*Eugenia caryophyllata* appartenant à la famille des *Myrtaceae* est une plante originaire des îles Moluques en Indonésie (Fig. 16), mais cultivé sur les îles de Penang, Ambon, Pemba, Zanzibar, Sumatra, Madagascar et Maurice ainsi que dans les Seychelles et les Antilles (Tyler et al., 1988). Les clous de girofle sont les boutons floraux aromatiques de L'*Eugenia caryophyllata* (Fig. 17).

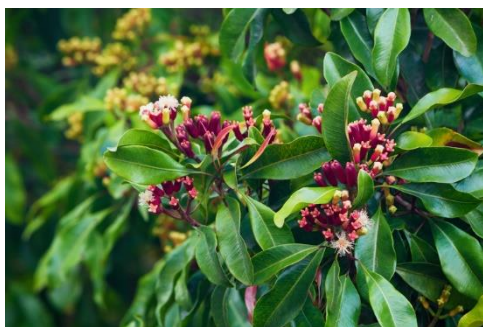


Fig. 16. *Eugenia caryophyllata*.



Fig. 17. Clou de girofle.

2.4.6.1 Propriétés

L'huile essentielle obtenue à partir des bourgeons de cette plante est utilisée comme un remède de maux de dents. La plante présente aussi des propriétés antioxydante, antiseptique, anti-irritante et carminative (Gülçin et al., 2004; Tyler et al., 1988). Dans la médecine traditionnelle Iranienne, les bourgeons de cette plante ont été utilisés comme un remède antiépileptique (Kamkar Asl et al., 2013).

L'extrait de l'*Eugenia caryophyllata* possède une activité antibactérienne contre des bactéries pathogènes (Burt and Reinders, 2003; Feres et al., 2005; Larhsini et al., 2001). Son efficacité antivirale est également bien documentée sur l'herpès (Kurokawa et al., 1995, 1998) et sur le virus de l'hépatite C (Hussein et al., 2000).

L'huile essentielle du clou de girofle est également utilisée comme anesthésique local et analgésique à des fins de stérilisation. Cela aurait également des activités antifongiques, anticonvulsivantes, anticancérigènes et antimutagènes (Harborne et al., 1999; Miyazawa and Hisama, 2001; Pourgholami et al., 1999; Zheng et al., 1992).

2.4.6.2 Principaux constituants

L'huile essentielle de clou de girofle comprend au total 23 constituants identifiés, parmi lesquels l'eugénol (76,8%), le β -caryophyllène (17,4%), l' α -humulène (2,1%) et l'acétate d'eugényle (1,2%) (Jirovetz et al., 2006).

2.4.7 *Cyperus rotundus*

Le *Cyperus rotundus* (Cyperaceae) est une plante médicinale traditionnelle en Chine, l'Inde et le Japon répandue dans les régions tropicales et subtropicales tempérées du monde (Fig. 18).

C'est l'une des herbes comestibles les plus anciennes connues et les plus importantes (Ardestani and Yazdanparast, 2007; Kilani et al., 2008a).



Fig. 18. *Cyperus rotundus*.



Fig. 19. Tubercules du *Cyperus rotundus*.

2.4.7.1 Propriétés

La partie tubéreuse du *Cyperus rotundus* (Fig. 19) est l'une des plus anciennes plantes médicinales connues utilisée comme analgésique, anti-inflammatoire, sédatif, antispasmodique, et pour soulager la diarrhée (Thebtaranonth et al., 1995; Zhu et al., 1997). Elle stimule la thyroïde, augmente le métabolisme et agit comme carminatif (Jagtap et al., 2004). L'extrait des tubercules du *Cyperus rotundus* prévient de manière significative les déficits cognitifs, ce qui suggère un potentiel thérapeutique de cet extrait dans les troubles neurodégénératifs liés au vieillissement et à l'âge (Rabiei et al., 2013). L'huile essentielle des tubercules de *Cyperus rotundus* présente des effets antibactériens, antimutagènes et antigénotoxiques (Kilani et al., 2005a).

2.4.7.2 Principaux constituants

L'huile essentielle du *Cyperus rotundus* est riche en mono et sesquiterpènes (Sonwa and König, 2001). Les principaux constituants de cette huile sont l' α -cypénone et le cypérene, qui représentent les composés les plus abondants (Kilani et al., 2008a). Les autres composés présents en quantités appréciables sont le cypérototundène, le rotundène et le cypérol (Kilani et al., 2005a).

2.4.8 Saussurea lappa

Le *Saussurea lappa* est une plante herbacée grande, robuste et vivace de la famille des astéracées (Fig. 20). Elle pousse au Cachemire, dans la région de l'Himalaya, au Pendjab et dans la région supérieure de la vallée de Kullu à une altitude de 2500-3000 m. Les racines sont chaudes, amères, douces, piquantes et flatteuses (Ambavade et al., 2009) (Fig. 21).



Fig. 20. *Saussurea lappa*.



Fig. 21. Racines du *Saussurea lappa*.

2.4.8.1 Propriétés

Le *Saussurea lappa* est une plante médicinale traditionnelle utilisée pour traiter l'asthme, l'inflammation, les rhumatismes, la toux, la tuberculose et de nombreuses autres maladies (Choi et al., 2012; Shah, 1982). Elle est également utilisée comme analgésique, digestif, aphrodisiaque, hépatoprotecteur et diurétique (Yaesh et al., 2010). Des études antérieures ont démontré que l'extrait des racines du *Saussurea lappa* possède plusieurs propriétés pharmacologiques, comme antioxydant (Saleem et al., 2013), antiulcéreux (Shah, 1982), anticancéreux (Kim et al., 2012), antiviral (Chen et al., 1995).

2.4.8.2 Principaux constituants

Les lactones sesquiterpéniques tels que costunolide et dehydrocostus lactone sont les constituants majeurs les plus communs du *Saussurea lappa* (Zahara et al., 2014). La plante contient également des flavonoïdes, lignanes, phénylpropanoïdes, alcaloïdes, triterpènes et phytostérols (Pandey et al., 2007; Robinson et al., 2008; Wang et al., 2008; Zhang et al., 2012).

2.4.9 *Dryobalanops aromatica*

Le *Dryobalanops aromatica*, communément connu sous le nom de « camphre de Bornéo », camphrier, ou camphre de Sumatra est une plante à fleurs ligneuse appartenant à la famille des Dipterocarpaceae (Fig. 22). On la trouve principalement à Sumatra, en Malaisie péninsulaire et à Bornéo (Ashton, 1988).



Fig. 22. *Dryobalanops aromatica*.



Fig. 23. Fruit du *Dryobalanops aromatica*.

2.4.9.1 Propriétés

Cette espèce était l'une des principales sources de camphre et attirait les premiers commerçants arabes à Bornéo, qui valaient alors plus que de l'or et utilisaient de l'encens et des parfums (Soepadmo et al., 1995) (Fig. 23).

Le camphre de Bornéo a une longue histoire d'utilisation médicinale, le liquide aromatique appelé « huile de camphre » et l'exsudat cristallisé, ou le camphre véritable, étant utilisés. Herbe amère, piquante et stimulante, elle est analgésique, antibactérienne, anti-inflammatoire, antispasmodique et fébrifuge. Elle est utilisée en interne pour traiter l'évanouissement ; les convulsions associées à une forte fièvre ; le choléra et la pneumonie. Elle est utilisée en externe pour traiter une gamme d'affections cutanées, notamment les ulcères, les ulcères buccaux, les abcès, les furoncles, l'herpès labial et la teigne. Elle est également utilisée pour traiter les rhumatismes, les maux de gorge, les infections pulmonaires et la conjonctivite. En aromathérapie, l'huile essentielle du camphre est utilisée à la fois en interne et en externe comme antiseptique, sédatif et tonique pour le cœur et le cortex surrénal. Elle est particulièrement appréciée pour les problèmes de peau, les rhumatismes, les maladies infectieuses, la dépression et la convalescence (Bown, 1995; Lee, 2000).

2.4.9.2 Principaux constituants

Comme d'autres genres de Dipterocarpaceae, le *Dryobalanops aromatica* est une bonne source d'oligomères de resvératrol (trans-3,4',5-trihydroxystilbène). Les composés majoritaires sont : La bergénine, le malaysianol A, le laevifonol, l'ampélopsine E, l' α -viniférine, l' ϵ -viniférine et la diptoindonésine A (Wibowo et al., 2011).

3 INTRODUCTION A LA GALENIQUE

3.1 Étymologie

« Galénique » dérive de « Galenus », il s'agit du nom latin du médecin grec du 2^{ème} siècle après J-C, Claude Galien (Claudius Galenus en latin) qui a contribué à définir les bases de la médecine européenne moderne. Il a donné son nom à la pharmacie galénique, science de la mise en forme des médicaments. La galénique est l'art de la formulation.

3.1.1 *Qu'est-ce qu'une forme galénique ?*

La forme galénique correspond à la forme donnée à un médicament, il peut s'agir d'un comprimé, d'une poudre, d'un sirop etc. Elle est en général choisie de manière que les principes actifs atteignent le plus facilement et le plus rapidement les organes ou les zones du corps auxquels ils sont destinés, elle permet aussi d'adapter un médicament aux contraintes particulières d'un patient. Elle est obtenue en choisissant les excipients adaptés.

3.1.2 *Les principales formes galéniques*

La plupart des médicaments sont présentés sous forme de comprimé (à avaler, croquer ou effervescents), de poudre (à mélanger ou à dissoudre), de gélule, de sirop, de suppositoire, de spray (nasale ou buccale), d'ampoule, de crème (baume, gel), de collyre.

3.2 La voie orale

L'ingestion orale d'agents thérapeutiques constitue le moyen préféré pour administrer des médicaments du point de vue de la facilité d'administration et de l'acceptabilité du patient. C'est la voie d'administration la plus utilisée dans environ 80 % des formes pharmaceutiques. Afin de formuler un actif avec un potentiel thérapeutique par voie orale, il faut adopter des méthodologies pour l'optimisation systématique de la stabilité de l'actif dans le tractus gastro-intestinal (TGI) (Fig. 24), l'obtention du profil pharmacocinétique et de la biodynamie souhaités, ainsi que la réduction des variabilités d'absorption et des effets secondaires (Burton et al., 1991).

La première étape est l'absorption. Un médicament fait face à ses plus grands obstacles lors de l'absorption. Les médicaments administrés par voie orale sont absorbés par le système digestif et acheminés via la veine porte vers le foie avant d'atteindre le reste du corps. Le foie

métabolise de nombreux médicaments par les enzymes métaboliques également connue sous le nom d'effet de premier passage hépatique, parfois à un point tel que seule une petite quantité de médicament actif émerge du foie vers le reste du système circulatoire. Ce premier passage hépatique réduit donc considérablement la biodisponibilité du médicament (Pond and Tozer, 1984).

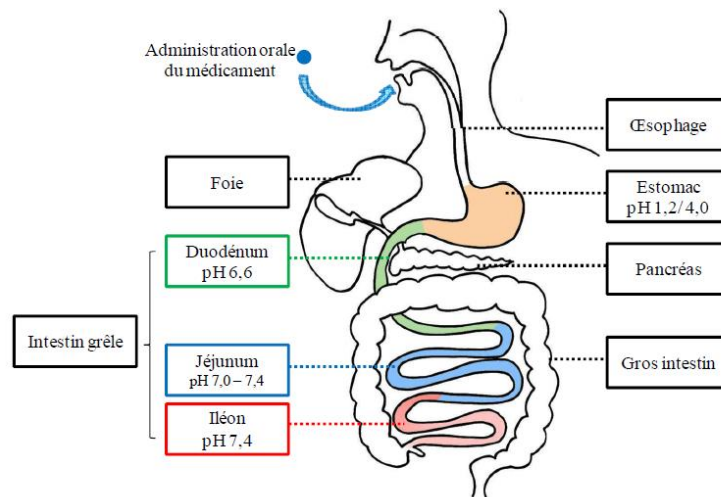


Fig. 24. Différents sites d'absorption du tractus gastro-intestinal.

Le tractus gastro-intestinal est conçu pour empêcher l'entrée d'agents pathogènes, de toxines et de macromolécules non digérées, tout en digérant et en absorbant de manière sélective les nutriments essentiels, les vitamines et les cofacteurs. La muqueuse intestinale utilise des mécanismes biochimiques et physiologiques pour compléter sa barrière physique afin d'empêcher l'entrée de substances indésirables. Ce sont ces mécanismes protecteurs du tractus gastro-intestinal qui doivent être judicieusement modifiés ou contournés pour l'administration orale de médicaments. Ces obstacles comprennent l'environnement acide hostile de l'estomac, l'activité enzymatique élevée de l'intestin grêle, la perméabilité intrinsèquement faible de la muqueuse intestinale, les capacités de liaison du contenu muqueux et luminal résident, les voies d'efflux retour dans la lumière intestinale après l'absorption dans les cellules épithéliales et le métabolisme de premier passage par le foie. Ces facteurs physiologiques doivent être pris en compte lors de la conception des tests *in vitro*, tels que les tests de dissolution des formes posologiques orales solides (Dressman et al., 1998).

3.2.1 Anatomie de l'épithélium intestinal

L'absorption des solutés dans le tractus gastro-intestinal se produit principalement dans les trois sections de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) et dans le gros intestin (côlon). Chacun de ces segments possède des propriétés anatomiques, biochimiques et physiologiques uniques qui dictent les paramètres de digestion et d'absorption du soluté (Tableau 2). La surface interne de l'intestin grêle présente trois types d'irrégularités ou de projections qui augmentent la surface potentielle pour la digestion et l'absorption (Daugherty and Mrsny, 1999).

On estime que les plis macroscopiques en forme de valvule, appelés plis circulaires, encerclant l'intérieur de la lumière intestinale augmentent la surface de l'intestin grêle de trois fois. Les villosités sont de minuscules projections en forme de doigts à peine visibles à l'œil nu, qui augmentent la surface d'environ 30 fois. Les microvillosités - projections de membrane de 1 μm de hauteur qui s'étendent depuis la surface apicale des entérocytes - augmentent davantage la surface de digestion et d'absorption d'environ 600 fois (Fig. 25). Les microvillosités et le glycocalyx associé établissent une structure de bordure en brosse qui présente une barrière catabolique considérable des activités enzymatiques. Le mucus recouvrant la surface épithéliale du tractus gastro-intestinal contient des glycoprotéines, des enzymes et des électrolytes. Le mucus est sécrété par les cellules caliciformes qui sont intercalées entre les entérocytes couvrant les villosités, ainsi que par des glandes sous-épithéliales, et agissent comme un site potentiel de liaison et d'interaction médicamenteuse (Larhed et al., 1998). Le pH des différents segments intestinaux varie de légèrement acide à légèrement basique. Dans certains cas, ces variations de pH peuvent influencer sur la stabilité ou la solubilité d'un médicament, ou les deux.

Bien que le tractus gastro-intestinal ait des propriétés de barrière impressionnantes et sélectives, certains agents pathogènes ont clairement réussi à surmonter les mécanismes de protection de l'intestin pour pénétrer dans la circulation systémique, entraînant une maladie grave ou même la mort. Dans un effort de protection contre la pénétration de tels agents pathogènes, la muqueuse intestinale contient plus de cellules lymphoïdes et produit plus d'anticorps que tout autre organe. Cette partie du système immunitaire est appelée tissu lymphoïde associé au tube digestif (Mestecky and McGhee, 1987). Les structures organisées des cellules lymphoïdes dans l'intestin grêle, en particulier dans l'iléon, sont connues sous le nom de plaques de Peyer (Fig. 25). D'autres cellules lymphoïdes comprennent les lymphocytes intraépithéliaux (IEL), intercalés entre les cellules épithéliales adjacentes.

Tableau 2. Caractéristiques biologiques et physiques du TGI humain. (Adapté de Daugherty and Mrsny, 1999).

Caractéristiques biologiques et physiques du TGI humain					
Segment GI	Surface (m ²)	Longueur (m)	Temps de résidence (h)	pH	Activités cataboliques importantes
Estomac	3,5	0,25	1,5	1 – 2	Protéase, lipases
Duodénum	1,9	0,35	0,5 – 0,75	4 – 5,5	Protéase, lipases
Jéjunum	184	2,8	1,5 – 2	5,5 – 7	Peptidases, lipases
Iléon	276	4,2	5 – 7	7 – 7,5	Peptidases, lipases
Colon/Rectum	1,3	1,5	1 – 60	7 – 7,5	Enzymes bactériennes

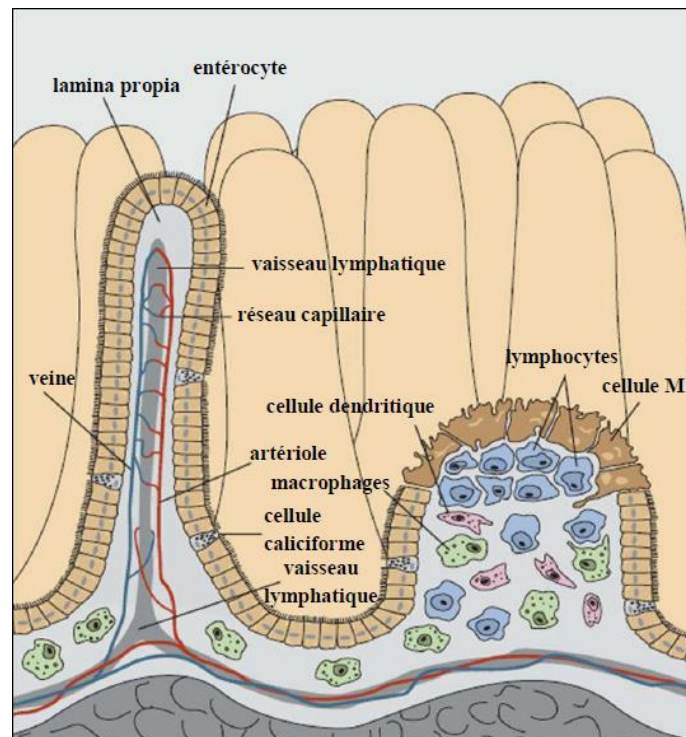


Fig. 25. Schéma des différents composants de l'épithélium intestinal. (Adaptée de Daugherty and Mrsny, 1999).

Latéralement, les cellules adjacentes de la barrière épithéliale se lient par des jonctions intercellulaires. Il existe quatre types de jonctions généralement présents sur ces sites aux membranes intercellulaires les plus apicales, trois jonctions individuelles : une jonction serrée suivie d'une jonction adhérente puis d'un desmosome forment un complexe de jonction apicale, et les jonctions communicantes gap (Fig. 26).

- Les jonctions serrées, dites « *zonula occludens* », sont un complexe jonctionnel multiprotéique dont la fonction générale est d'empêcher le mélange de protéines membranaires entre les membranes apicale et basolatérale ; et de contrôler le passage paracellulaire des ions et des solutés entre les cellules (Hartsock and Nelson, 2008).
- Les jonctions adhérentes dites « *zonula adherens* », remplissent de nombreuses fonctions, notamment l'initiation et le maintien de l'adhésion cellule-cellule, la régulation du cytosquelette d'actine, la signalisation intracellulaire et la régulation transcriptionnelle (Hartsock and Nelson, 2008).
- Les desmosomes sont des jonctions de type « *macula adherens* » qui assurent la résistance mécanique du tissu en retenant fermement les cellules de l'épithélium entre elles (Garrod, 1993).
- Les jonctions communicantes, dites « jonctions *gap* », connectent directement le cytoplasme de deux cellules, et contrôlent le passage des petites molécules, ions et impulsions électriques (Lampe and Lau, 2004).

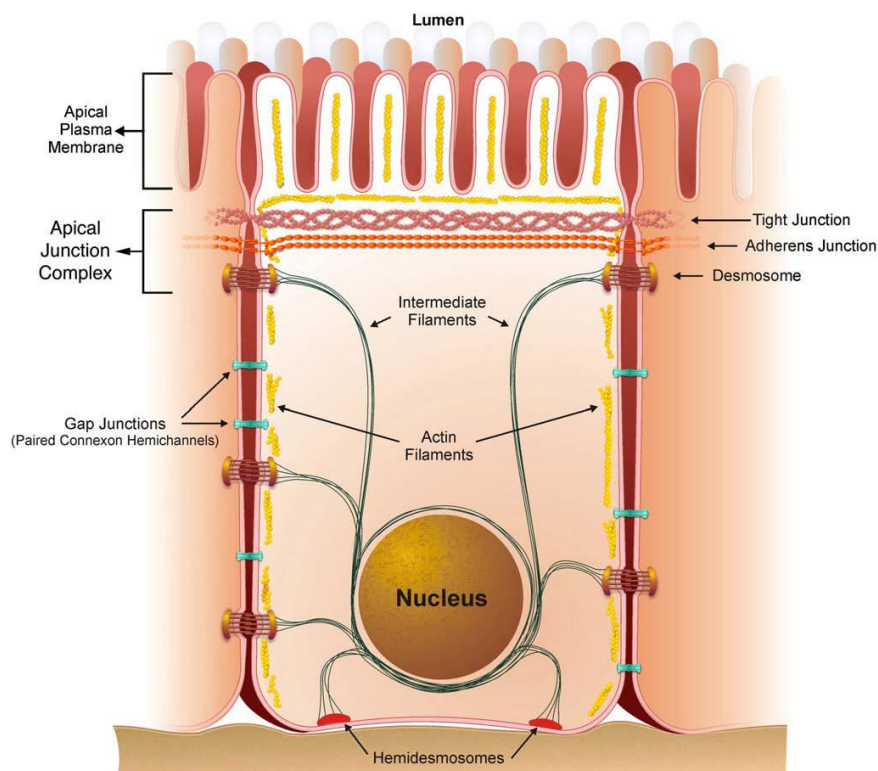


Fig. 26. Les différents types de jonctions entre les cellules épithéliales. (Adaptée de Guttman and Finlay, 2009)

3.3 Absorption intestinale

3.3.1 Transport passif

La diffusion passive est le mécanisme de passage le plus courant. Elle consiste en un mouvement des molécules sans apport d'énergie et selon un gradient de concentration. La diffusion se poursuivra jusqu'à l'élimination de ce gradient. Le taux de transport passif dépend des caractéristiques de la molécule ainsi que de la perméabilité de la membrane cellulaire, laquelle dépend à son tour de l'organisation et des caractéristiques des lipides et des protéines de la membrane (Fig. 27). Les principaux types de transport passif sont la diffusion simple qui représente le passage des solutés à travers la membrane cytoplasmique lorsque leur concentration dans le milieu extracellulaire est supérieure à celle du milieu intracellulaire (molécules apolaires, O₂, CO₂, éthanol) et la diffusion facilitée assurée par des protéines intégrales transmembranaires spécifiques et des protéines-canal permettant le passage de la molécule à travers la membrane (molécules polaires, ions) (Daugherty and Mrsny, 1999).

Un niveau minimum de lipophilie est nécessaire pour que les molécules se répartissent dans les membranes des cellules épithéliales et soient absorbées de manière transcellulaire par diffusion passive. Sans ce degré minimal de lipophilie, aucune absorption passive ne peut avoir lieu, à moins que ce soit par la voie paracellulaire, option qui n'est pas envisageable pour les macromolécules, car elle est limitée à des composés relativement petits pouvant traverser les jonctions serrées (inférieurs à 100-200 Da) (Camenisch et al., 1998).

3.3.2 Transport actif

Le transport actif est le mouvement de molécules à travers la membrane cytoplasmique contre le gradient de concentration. Ce transport spécifique des molécules polaires ou faiblement lipophiles nécessite la présence de macromolécules ou de complexes macromoléculaires insérés dans la membrane cytoplasmique ou impliquant des vésicules d'endocytose (Fig. 27). Ce transport nécessite de l'énergie cellulaire pour fonctionner souvent fournie par de l'ATP (Daugherty and Mrsny, 1999).

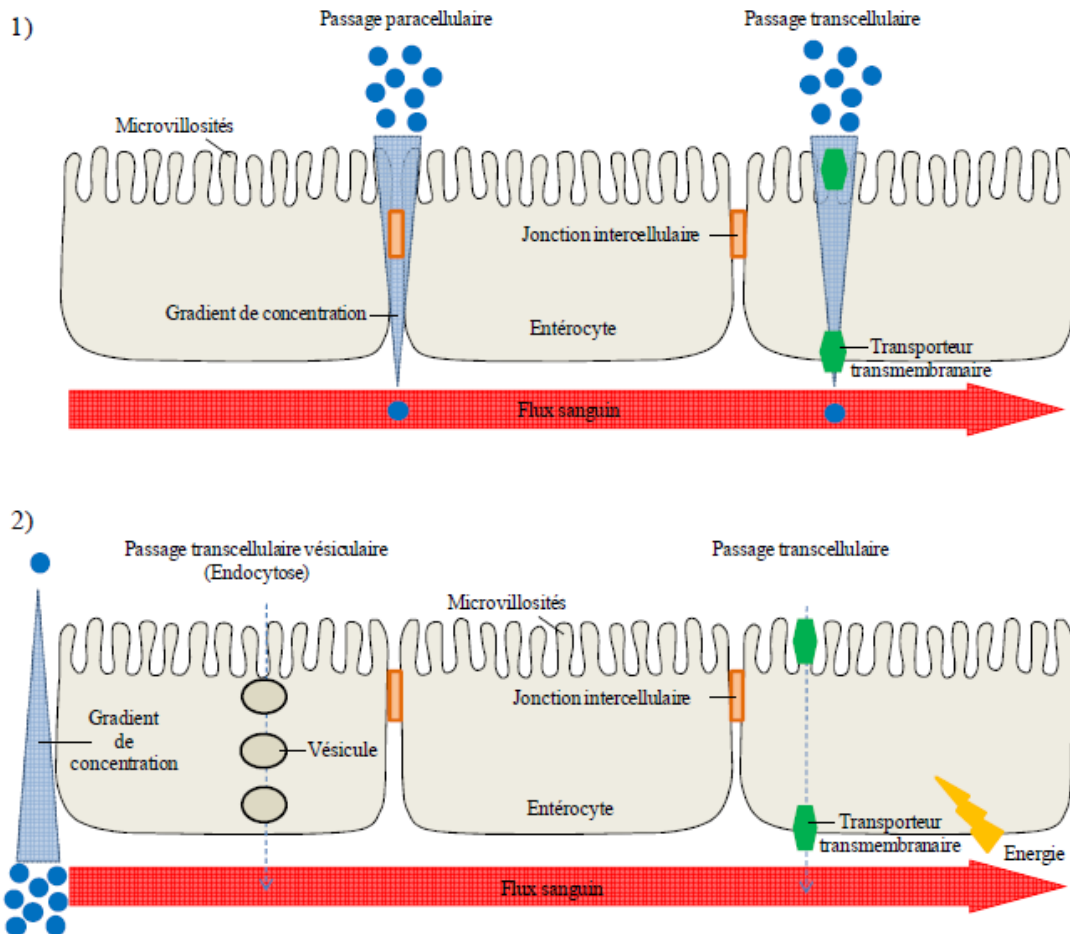


Fig. 27. Passage des molécules à travers la barrière intestinale par 1) transport passif et 2) transport actif (Ralay-Ranaivo, 2012).

3.4 Système nerveux central et barrières cérébrales

Les échanges moléculaires entre le sang et le tissu nerveux sont limités et régulés essentiellement par trois barrières : la barrière hémato-liquide céphalorachidien (BHLCR), formée par les cellules épithéliales du plexus choroïde faisant face au LCR ; la barrière arachnoïdienne avasculaire qui entoure complètement le SNC sous la dure-mère ; et la barrière hémato-encéphalique (BHE) composée de cellules endothéliales cérébrales (CEC) délimitant des microvaisseaux cérébraux (Fig. 28) (Abbott, 2004). Bien que ces trois interfaces forment des barrières entre le système nerveux central et le sang, la BHE est considérée comme le site principal de l'échange sang – SNC et est responsable du maintien de l'homéostasie du SNC (Abbott et al., 2010; Bernacki et al., 2008). Les cellules endothéliales cérébrales, avec les astrocytes, les péricytes, les microglies, les neurones et la matrice extracellulaire, forment l'unité neurovasculaire (Fig. 29), un système hautement coordonné

qui régule de manière dynamique la perméabilité microvasculaire cérébrale et fournit une base pour comprendre le développement et la physiologie de la BHE, notamment: les mécanismes par lesquels les médicaments et les maladies peuvent influencer sur la perméabilité microvasculaire cérébrale (Abbott et al., 2006; Hawkins and Davis, 2005; Lecrux and Hamel, 2011; Persidsky et al., 2006).

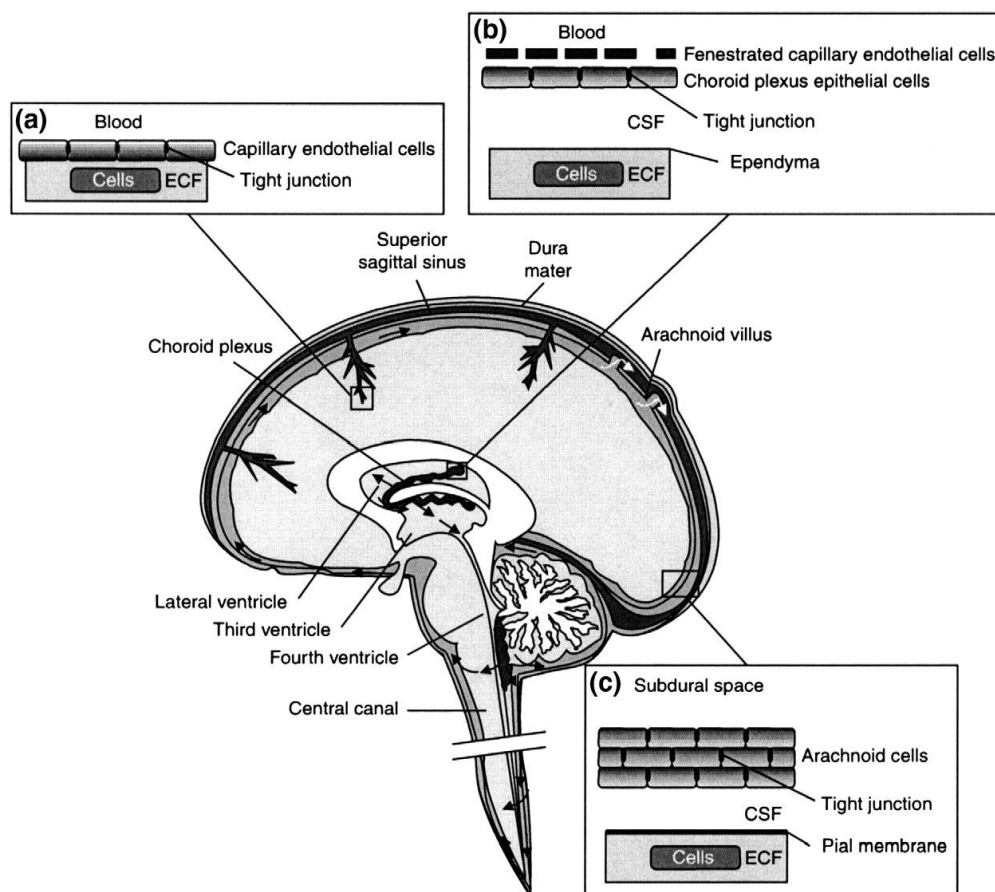


Fig. 28. Schéma des trois principales barrières entre le sang et le cerveau. (a) La barrière hémato-encéphalique (BHE). (b) La barrière hémato-liquide céphalorachidien (BHLCR). (c) La barrière d'arachnoïde. (Adaptée de Kandel et al., 2000).

3.4.1 Barrière hémato-encéphalique (BHE)

La BHE agit comme une barrière physique, régulant le passage des molécules du sang au cerveau et limitant ainsi les types de médicaments pouvant atteindre le cerveau lors de l'administration systémique : plus de 98% des molécules thérapeutiques potentielles sont incapables de traverser la BHE (Pardridge, 2002). La microvascularisation cérébrale a une surface totale de 20 m² et une longueur totale de 640 km. Cette vascularisation massive donne au cerveau la possibilité d'être imprégné de petites molécules par simple diffusion en une demi-seconde (Pardridge, 2003). Cependant, contrairement aux capillaires périphériques,

ceux du cerveau présentent peu de vésicules de pinocytose et des jonctions serrées particulières, qui régulent étroitement le mouvement des molécules par la voie paracellulaire, et comprenant une barrière presque imperméable aux médicaments administrés par la circulation périphérique (Blasi et al., 2007). Les structures accessoires périendothéliales, appelées astrocytes, ont une multitude de fonctions importantes pour l'homéostasie cérébrale (maintien des taux d'ions de potassium, inactivation des neurotransmetteurs, régulation et production de facteurs de croissance et de cytokines) (Fig. 29).

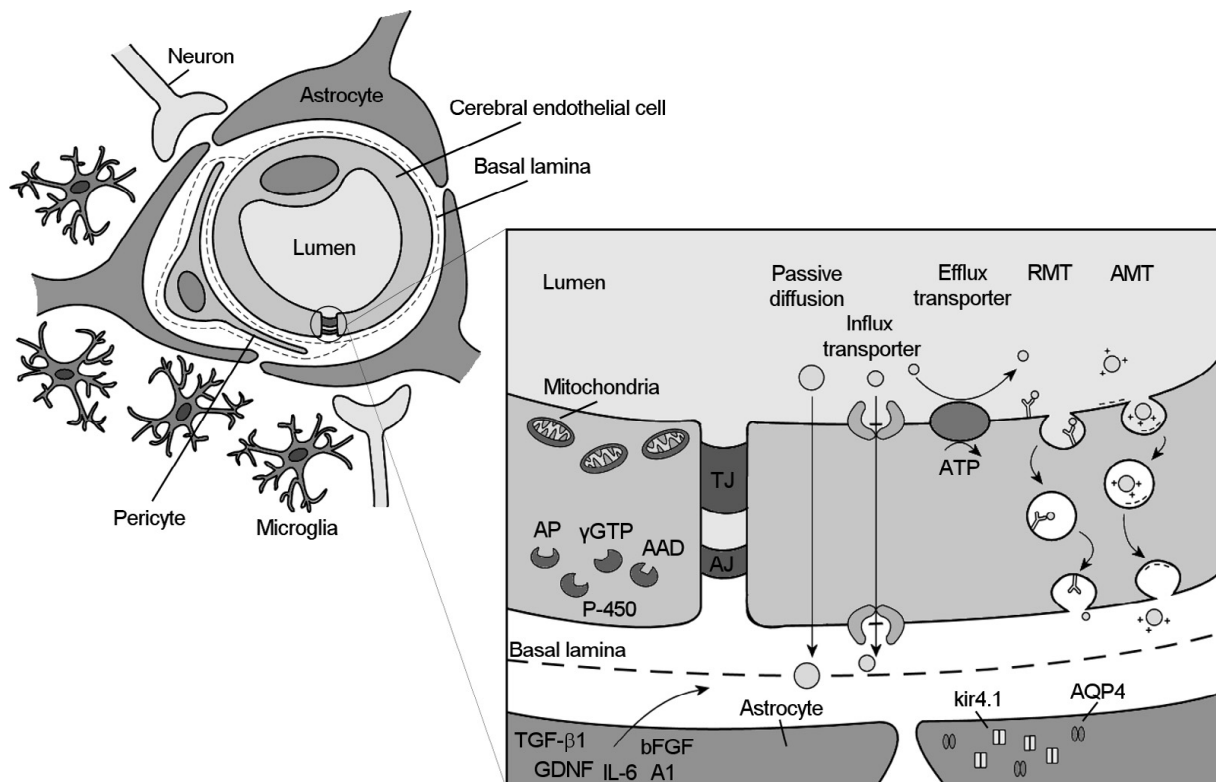


Fig. 29. Représentation structurelle d'une unité neurovasculaire : la BHE composée de cellules endothéliales cérébrales, les péricytes, astrocytes et les microglies. (Adaptée de Abbott et al., 2006).

Selon Patel et al., 2013, Le transport des molécules de soluté à travers la BHE s'effectue par quatre mécanismes différents (Fig. 30) :

- Diffusion paracellulaire : il s'agit du passage des petites molécules hydrosolubles entre les cellules. Ce passage est limité considérablement par la présence des jonctions serrées.
- Diffusion transcellulaire : elle a lieu à travers la membrane lipidique des cellules endothéliales cérébrales qui offre une voie de diffusion efficace pour les agents

liposolubles ayant un faible poids moléculaire inférieur à 450 Da. La plupart des médicaments du SNC pénètrent par diffusion transcellulaire.

- Transport facilité : les échanges de substances entre le sang et le cerveau, ont lieu par le biais des transporteurs spécifiques qui facilitent le transfert de nutriments. Comme le glucose constitue la principale source d'énergie pour le cerveau, les transporteurs de glucose tels que GLUT1 et GLUT3 sont d'une grande importance (Zlokovic, 2008).
- Endocytose à récepteurs : certaines grandes protéines et hormones endogènes (insuline, transferrine) sont capables de traverser la BHE par endocytose, médiée par des récepteurs spécifiques (Bickel et al., 2001). Les lipides peuvent également être internalisés dans le cerveau sous forme de lipoprotéines de basse densité (LDL) (Blasi et al., 2007). Les protéines polycationiques (telles que les albumines cationisées ou les immunoglobulines) peuvent être transportées à travers la BHE au moyen d'une transcytose par adsorption, sans implication de récepteurs spécifiques de la membrane plasmique. Dans ce cas, l'endocytose est initiée par l'association de substances polycationiques avec les charges négatives présentes sur la membrane plasmique des cellules endothéliales (Smith and Gumbleton, 2006).

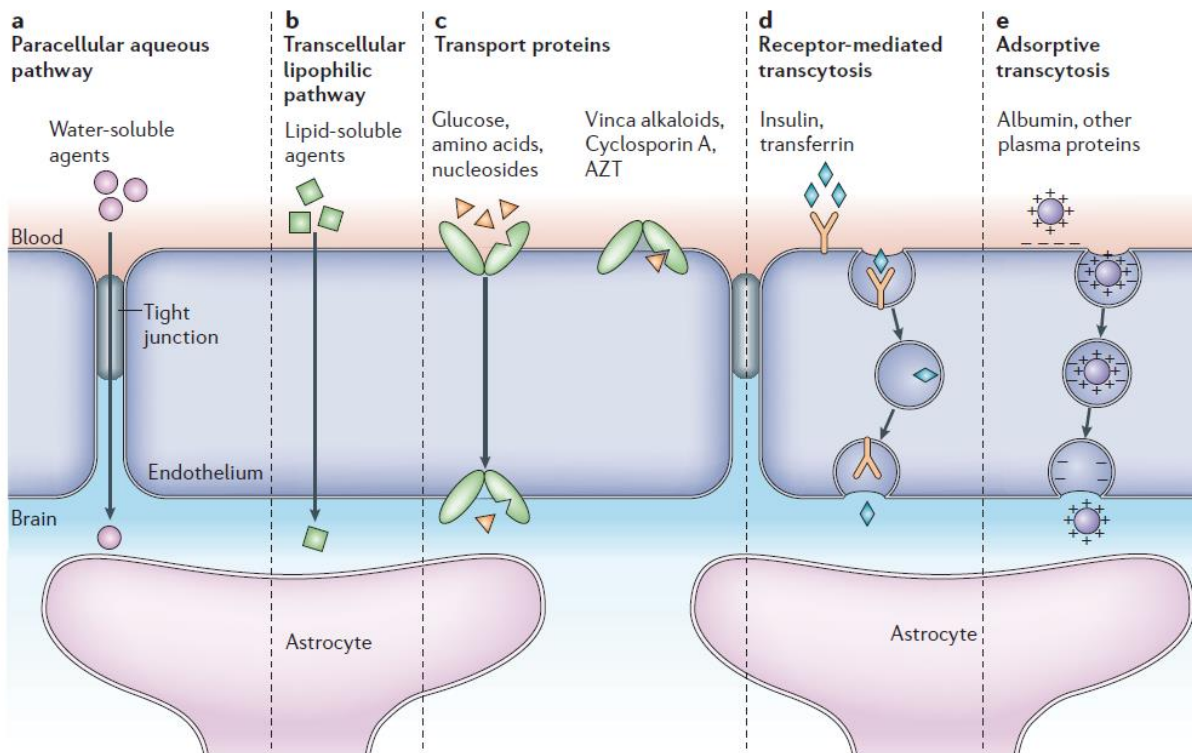


Fig. 30. Différentes voies de passage à travers la barrière hémato-encéphalique. a) Diffusion paracellulaire. b) Diffusion transcellulaire. c) Transport facilité. d) Endocytose et transcytose à médiation par un récepteur. e) Endocytose et transcytose par adsorption. (Adaptée de Abbott and Romero, 1996).

3.5 Techniques développées pour améliorer la biodisponibilité orale

- Amélioration de la solubilité et de la vitesse de dissolution : modifications physiques et chimiques.
- Modification du coefficient de partage.
- Prévention du métabolisme hépatique au premier passage : co-administration avec un autre médicament, prodrogues pour réduire le métabolisme présystémique.
- Prévention de la dégradation dans le tractus gastro-intestinal : enrobage entérique, utilisation de formes gastrorésistantes, utilisation de polymères bioadhésifs (mucoadhésifs).
- Inhibition de l'efflux de la glycoprotéine P : en utilisant des inhibiteurs de la glycoprotéine P (qui empêche l'accumulation des molécules dans le cerveau).
- Nouveaux systèmes d'administration de médicaments : nanosuspensions, microémulsions, système d'administration de médicament auto-émulsifiant, nanoparticules lipidiques solides, nanoparticules polymères, systèmes vésiculaires tels que les liposomes, les niosomes (Hetal et al., 2010).

3.6 Systèmes émulsionnés et innovations pharmaceutiques

Les émulsions, sont des systèmes comportant au moins deux phases liquides non miscibles, en général de l'eau et l'huile, dispersées l'une dans l'autre sous forme de gouttes. Il s'agit de systèmes hors équilibre thermodynamique en raison de l'énergie libre à l'interface entre les deux phases. La formulation des systèmes émulsionnés nécessite donc l'utilisation de tensioactifs pour réduire la tension interfaciale et améliorer la stabilité cinétique de ces systèmes (Fig. 31).

L'appellation « émulsion » désigne une famille de systèmes comprenant les macroémulsions, les nanoémulsions et les miniémulsions, se distinguant par le diamètre de gouttes, et sont largement utilisées dans différents domaines dont celui de la pharmacie.

Les systèmes émulsionnés peuvent être classés en fonction de la nature des phases continue et dispersée. La phase dispersée peut être soit de l'huile, on parle alors d'émulsions directes huile/eau (H/E), soit la phase aqueuse, on obtient alors des émulsions inverses eau/huile (E/H). Les émulsions peuvent aussi être triphasiques. Il s'agit alors d'émulsions multiples (E/H/E ou H/E/H) (Tadros, 2013).

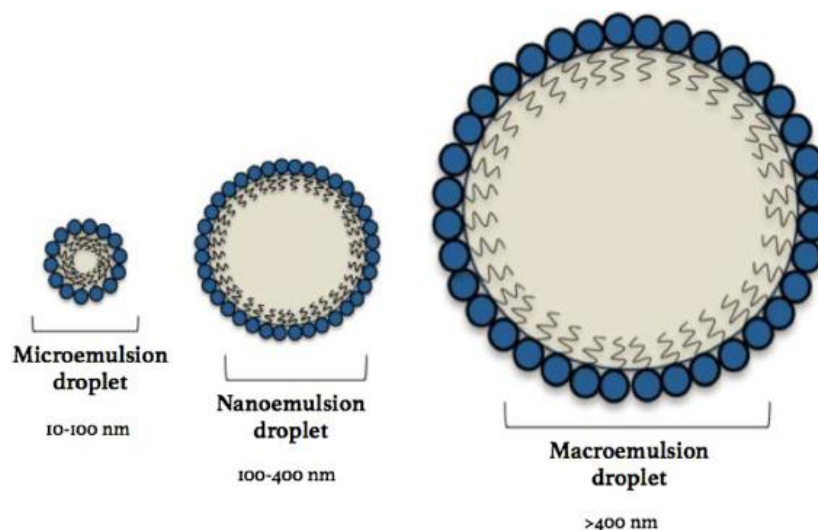


Fig. 31. Types et tailles de diamètre de gouttelettes typiques des macro, nano et microémulsions. Lors de l'addition de surfactant, les queues de surfactant non polaires s'orientent vers la phase huileuse interne, tandis que les groupes de tête de surfactant polaire s'orientent vers la phase aqueuse externe (Callender et al., 2017).

3.6.1 Les cyclodextrines

Les cyclodextrines (CD), sont une famille d'oligosaccharides cycliques, constituées de sous-unités de glucose liées par des liaisons α -1,4 glycosidiques (Fig. 32). Elles sont produites industriellement à partir d'amidon par conversion enzymatique à l'aide de la cyclodextrine glycosyltransférase. Les molécules principalement utilisées sont l' α , β et γ -cyclodextrines avec 6, 7 et 8 monomères de glucose respectivement (Szejtli, 1998).

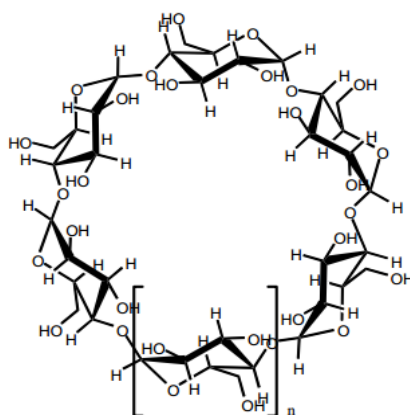


Fig. 32. Structure Générale des Cyclodextrines.

Les cyclodextrines possèdent des propriétés intéressantes, dont la capacité de solubiliser/complexer des molécules hydrophobes dans l'eau, grâce à leur cavité interne hydrophobe et leur côté externe hydrophile. Elles possèdent une structure chimique bien définie, une faible activité biologique intrinsèque, une grande stabilité thermique et une bonne solubilité aqueuse (Fig. 33).

L'application pharmaceutique la plus courante des cyclodextrines, comme vecteurs de médicaments à haute performance dans les systèmes d'administration, consiste à améliorer la solubilité, la stabilité, et la biodisponibilité des molécules de médicaments. Récemment, divers types de dérivés de cyclodextrines ont été préparés de manière à étendre les propriétés physicochimiques et la capacité d'inclusion des cyclodextrines en tant que nouveaux vecteurs de médicaments (Uekama et al., 1998).

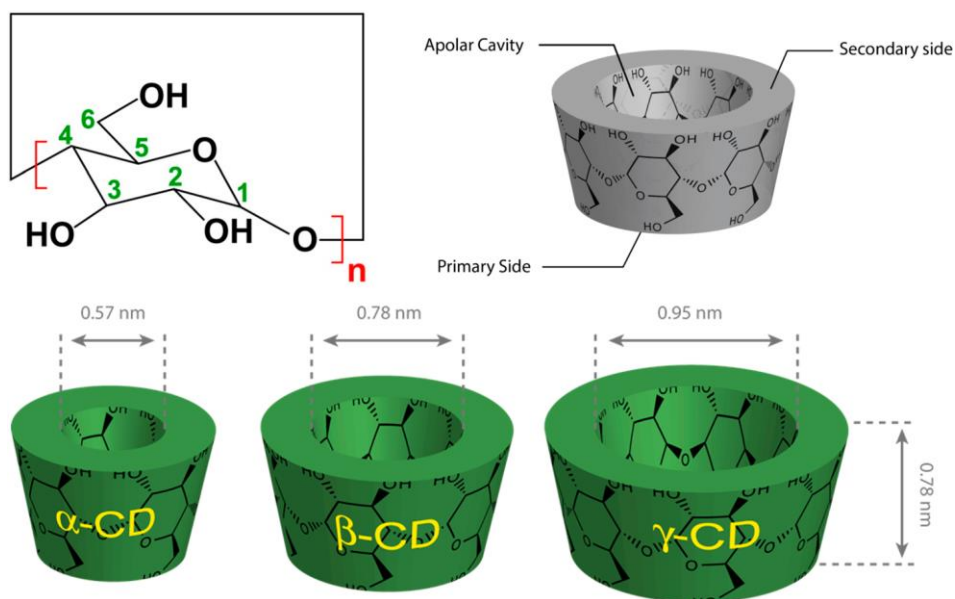


Fig. 33. Schéma structurel fonctionnel de α -CD ($n = 6$), de β -CD ($n = 7$) et de γ -CD ($n = 8$). En bas : dimensions géométriques des cyclodextrines (Crini, 2014).

3.6.2 Les microémulsions

Les microémulsions sont des systèmes monophasiques, formées à l'équilibre par un système ternaire eau-huile-tensioactif. Elles sont généralement transparentes, isotropes, de faible viscosité et thermodynamiquement stables contrairement aux macro/mini/nano émulsions.

Les microémulsions présentent des micro-domaines de petite dimension, typiquement de l'ordre de 10 à 50 nm, fluctuant rapidement dans le temps et dans l'espace. Elles sont produites par une émulsification spontanée qui nécessite une très légère agitation et une concentration importante en tensioactifs (Salager et al., 2001).

Les microémulsions peuvent être administrées par voie orale, ce qui présente un réel intérêt pour une utilisation médicale. En effet, la motilité de l'estomac et de l'intestin fournit une agitation suffisante au processus d'émulsification *in vivo* (Fig. 34).

Les fines particules lipidiques dispersées en phase aqueuse offrent une grande surface de contact avec l'épithélium digestif améliorant ainsi l'absorption des principes actifs lipophiles.

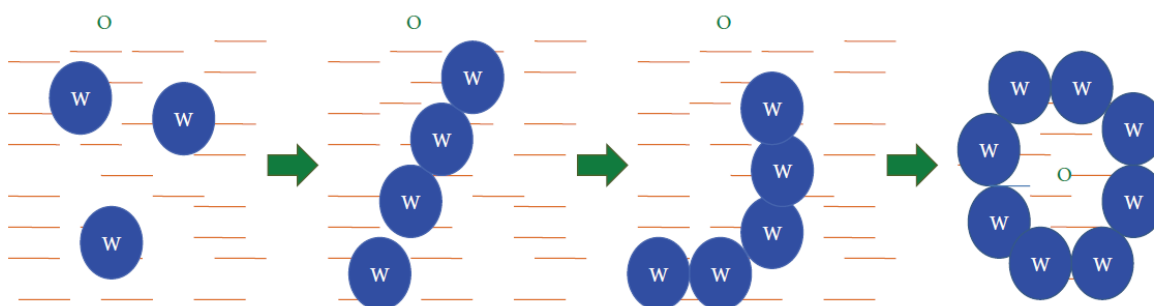


Fig. 34. Représentation schématique du mécanisme d'émulsification des microémulsions (Gupta et al., 2013).

3.6.3 Les nanoparticules comme véhicules pour traverser la BHE

Il est possible de franchir la BHE et de surmonter les mécanismes de protection associés en utilisant des systèmes colloïdaux (micelles, liposomes, nanoparticules) conçus pour administrer des médicaments au système nerveux central. Les supports de médicaments colloïdaux ont généralement une taille comprise entre 1 et 1000 nm et sont constitués d'agrégats moléculaires au sein desquels les actifs thérapeutiques peuvent être adsorbés, piégés ou liés de manière covalente. Les nanoparticules en particulier sont très intéressants pour la délivrance de médicaments, grâce à leur polyvalence (Barbu et al., 2009).

Les nanoparticules peuvent améliorer le transport des médicaments vers le SNC par un certain nombre de mécanismes différents (Kreuter and Gelperina, 2008) :

- Par endocytose à travers la couche de cellules endothéliales, permettant le transport de l'actif.
- Par inhibition des systèmes d'efflux transmembranaires (à savoir, la glycoprotéine P).
- Par ouverture des jonctions serrées entre les cellules endothéliales permettant au médicament de pénétrer.
- Par solubilisation des lipides de la membrane des cellules endothéliales, par les tensioactifs associés aux nanoparticules ; cela conduit à une fluidisation de la membrane (effet tensioactif).
- Par production des effets toxiques locaux sur le système vasculaire cérébral, qui conduit à une perméabilisation limitée des cellules endothéliales du cerveau.
- Par interaction des charges cationiques des nanoparticules avec les charges négatives présentes sur la membrane plasmique des cellules endothéliales, améliorant ainsi, l'administration de médicaments par la BHE (Karkan et al., 2008; Mazza et al., 2008).

3.7 Nanoparticules lipidiques solides (SLN)

Les SLN (Solid Lipid Nanoparticles), sont des nanosphères fabriquées à partir de lipides solides ; leur diamètre moyen en spectroscopie à corrélation de photons est d'environ 50 à 1000 nm (Fig. 35). Elles consistent en une matrice lipidique solide, c'est-à-dire des glycérides, des acides gras ou des cires, stabilisée par des émulsifiants compatibles sur le plan physiologique, tels que des phospholipides, des sels biliaires, des polysorbates (Tween™), des éthers de polyoxyéthylène et d'alcools polyvinyliques. Les lipides utilisés dans leur production sont solides à la température ambiante (Battaglia and Gallarate, 2012; Lasaracibar et al., 2012). Ils sont généralement produits par la méthode d'homogénéisation à chaud, qui implique généralement l'utilisation d'une homogénéisation à haute pression (HPH) (Müller et al., 2000).

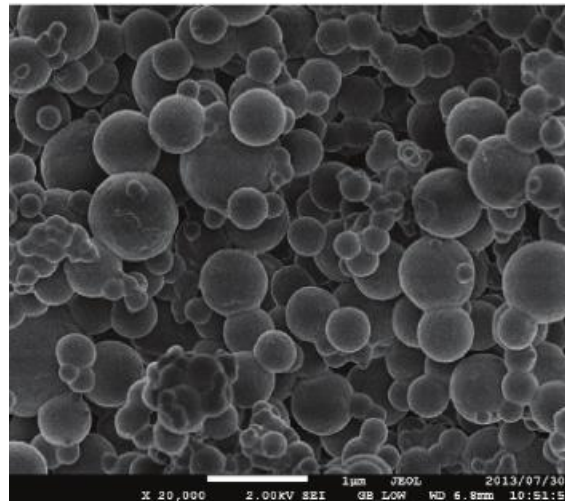


Fig. 35. Microscopie électronique à balayage de SLN chargées de médicament (Omwoyo et al., 2014).

Les SLN sont considérées comme des nouveaux systèmes de libération prolongée de médicaments et offrent une amélioration significative de la délivrance de médicaments par les voies d'administration topique, orale et parentérale (Fig. 36). En particulier, l'encapsulation de médicaments dans des SLN peut aider à :

1. résoudre les problèmes dus à leur faible solubilité dans l'eau.
2. les protéger des processus chimiques et physiques de dégradation et d'évaporation.
3. fournir une libération lente dans le temps.
4. diriger la substance piégée vers une cible spécifique et/ou franchir plusieurs barrières biologiques.

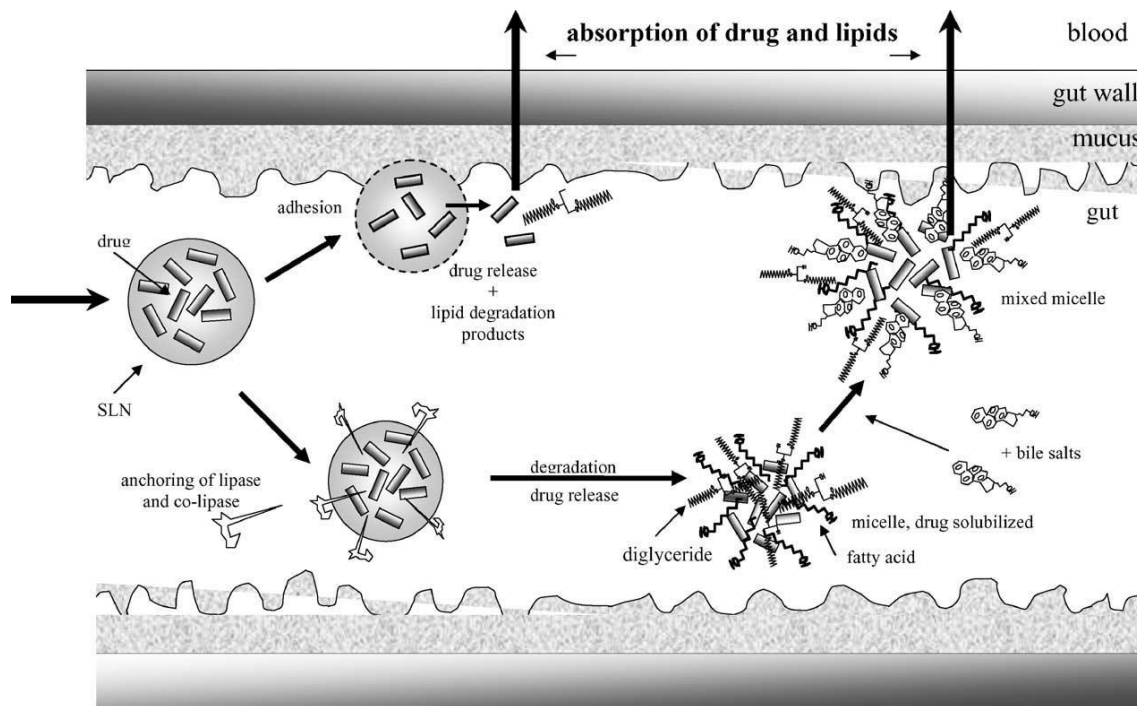


Fig. 36. Mécanismes de libération d'actifs distribués sous forme de SLN (Muller and Keck, 2004).

3.7.1 SLN en tant que système d'administration de médicaments vers le SNC

Une grande attention a été portée sur le SLN en tant que moyen possible de franchir la BHE, car ils présentent plusieurs avantages en tant que systèmes de délivrance de médicaments (Patel et al., 2013). En particulier :

- Une bonne biocompatibilité
- Une capacité de chargement de médicaments pertinente
- Une fabrication évitant l'utilisation de solvants organiques
- Une production à grande échelle
- La libération contrôlée du médicament peut durer plusieurs semaines
- Le potentiel de ciblage des médicaments est amélioré
- Les formulations SLN sont stables jusqu'à 3 ans, ce qui représente un avantage très significatif par rapport aux autres systèmes de support colloïdal

Les SLN sont fréquemment proposés comme systèmes d'administration de médicaments pour divers composés ciblés vers le SNC. De nombreux composés, qui diffèrent par leurs propriétés chimiques et biologiques, ont été encapsulés en SLN pour améliorer leur pénétration dans le système nerveux central. Bien que près de 98% des médicaments ne franchissent pas la BHE, 2% peuvent le traverser, à des degrés divers et par différents

mécanismes. De nombreux travaux expérimentaux visant à administrer des médicaments au système nerveux central sont associés à ce type de médicaments : par conséquent, les résultats encourageants obtenus sont principalement dus à l'amélioration, par l'encapsulation dans la SLN, du profil biologique d'une molécule, qui traverse la BHE de manière autonome. Les SLN utilisées pour administrer des médicaments au système nerveux central peuvent agir selon trois principaux modes d'action complémentaires :

1. Stabiliser les molécules souffrant d'instabilité physico-chimique ou biologique : en les protégeant de l'hydrolyse jusqu'à leur libération, prolongeant ainsi leur demi-vie dans le sang, lors de l'administration en SLN. En conséquence, l'accumulation dans le cerveau augmente considérablement. Exemple : la Camptothécine (Yang et al., 1999a, 1999b).
2. Amélioration de la biodisponibilité d'un médicament capable de traverser la BHE : basée sur une modification de la surface à l'aide de tensioactifs. Deux explications sont avancées : premièrement, la modification provoque un effet d'encombrement stérique, qui diminue l'adsorption de l'opsonine sur les SLN dans le plasma réduisant ainsi l'absorption par le système réticulo-endothélial (RES) et prolongeant le temps de rétention dans le plasma. Deuxièmement, une rétention accrue des SLN dans les capillaires cérébraux combinée à une adsorption sur les parois capillaires peut créer un gradient de concentration plus élevé, ce qui améliore le transport des SLN à travers la couche de cellules endothéliales et, par conséquent, leur acheminement vers le cerveau. Exemple : la clozapine (Manjunath and Venkateswarlu, 2005), la pipérine (Buhner, 2012; Yusuf et al., 2013), la Bromocriptine (Esposito et al., 2008). Témzolomide (Huang et al., 2008), la noscapine (Madan et al., 2013).
3. Augmenter la perméabilité d'un médicament à travers la BHE : Le revêtement des SLN avec des tensioactifs est une stratégie valable pour ouvrir les jonctions serrées entre les cellules endothéliales dans le système vasculaire cérébral créant ainsi une voie paracellulaire pour leur translocation (Blasi et al., 2011, 2013; Göppert and Müller, 2005).

3.8 Production des SLN

Les SLN sont préparées à partir de lipides, émulsifiants et eau/solvant en utilisant différentes méthodes. Les principales méthodes de préparation des SLN sont décrites ci-dessous.

3.8.1 Homogénéisation à haute pression (HPH)

C'est une technique fiable et puissante. Il s'agit d'une homogénéisation qui pousse le liquide à haute pression (100-2000 bars) à travers un espace étroit de quelques microns. Le fluide accélère sur une très courte distance à une vitesse très élevée, supérieure à 1000 km/h. Des efforts de cisaillement et des forces de cavitation très élevés perturbent les particules jusqu'à la plage submicronique. Les deux méthodes générales de l'HPH sont l'homogénéisation à chaud et l'homogénéisation à froid (Fig. 37). Pour les deux techniques, l'actif est solubilisé dans le lipide en cours de fusion à environ $5 \pm 10^\circ\text{C}$ au-dessus de son point de fusion. (Ekambaram et al., 2012; Müller et al., 2000).

3.8.1.1 Homogénéisation à chaud

Est généralement effectuée à des températures supérieures au point de fusion du lipide. La masse lipidique fondue contenant l'actif est dispersée sous agitation dans une solution aqueuse chaude de tensioactif par un dispositif de mélange à cisaillement élevé. La pré-émulsion H/E est ensuite homogénéisée à haute pression et la microémulsion obtenue est refroidie à température ambiante afin que les gouttelettes lipidiques liquides puissent se solidifier et former la structure intrinsèque du SLN. L'augmentation de la température d'homogénéisation ou du nombre de cycles entraîne souvent une augmentation de la taille des particules due à une énergie cinétique élevée des particules. Généralement, on utilise 3-5 cycles d'homogénéisation à une pression de 500 - 1500 bars (Fig. 37). Il est nécessaire d'utiliser cette technique lors de la formulation d'actifs hydrophiles, car ils se répartiraient entre le lipide fondu et la phase aqueuse au cours du processus d'homogénéisation à chaud (Lippacher et al., 2000; Müller et al., 2000).

3.8.1.2 Homogénéisation à froid

A été développée pour résoudre divers problèmes liés à l'homogénéisation à chaud, tels que : la dégradation de l'actif induite par la température, la distribution d'actif dans la phase aqueuse, les transitions de phase imprévisibles du lipide en raison de la complexité de la cristallisation. Dans cette technique, la masse lipidique fondue contenant l'actif est refroidie

rapidement en utilisant de la glace carbonique ou de l'azote liquide. Le lipide solide obtenu est broyé en microparticules lipidiques. Ces microparticules sont ensuite dispersées dans une solution froide de tensioactif, donnant une pré-suspension. Ensuite, cette pré-suspension est homogénéisée à haute pression à température ambiante ou en dessous pour assurer l'état solide du lipide pendant l'homogénéisation. Les forces de cavitation sont suffisamment fortes pour casser les microparticules lipidiques directement en nanoparticules lipidiques solides (Fig. 37). Cependant, comparées à l'homogénéisation à chaud, les tailles de particules sont plus grandes et la distribution de taille est plus large (Müller et al., 2000).

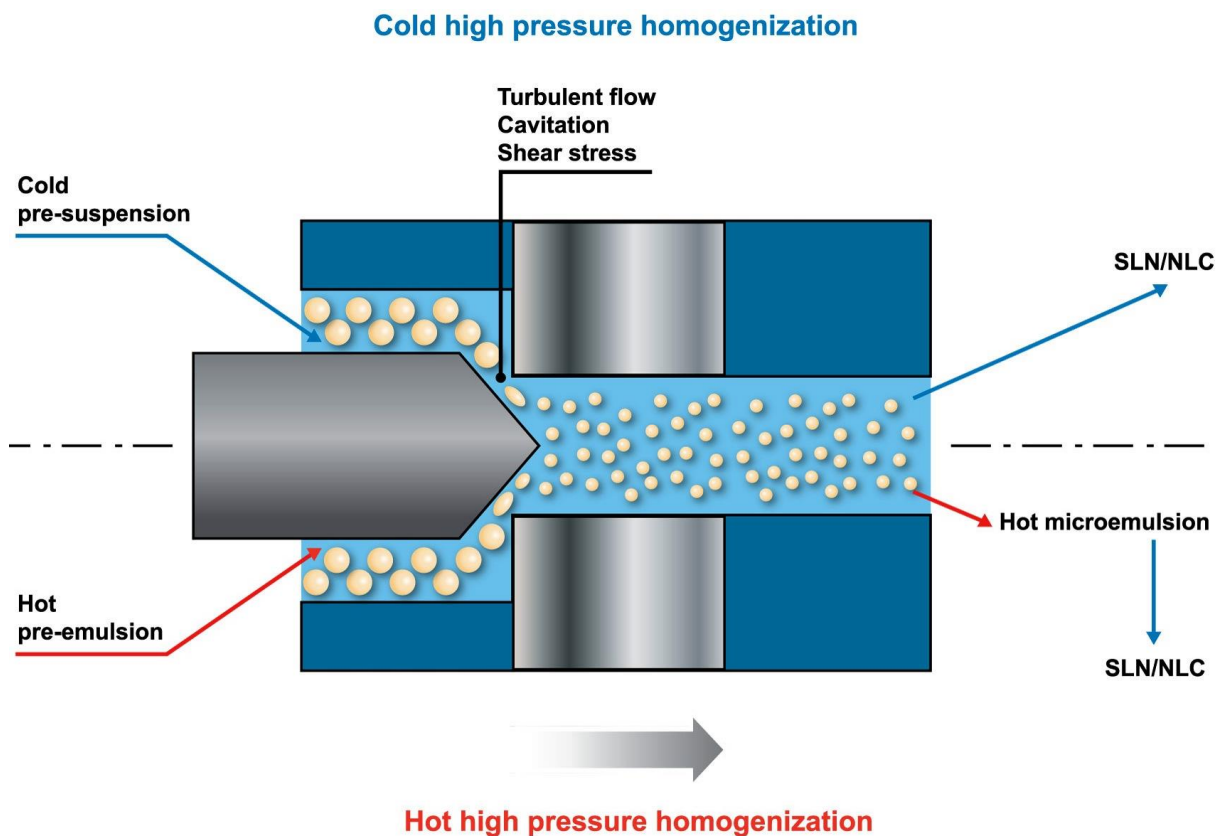


Fig. 37. Représentation schématique du mécanisme d'homogénéisation à haute pression pour la préparation des SLN (Svilenov and Tzachev, 2014).

3.8.2 Ultrasonication

Dans cette méthode, l'actif est ajouté à la phase lipidique fondue. La phase aqueuse chaude est ajoutée à la masse lipidique fondue, émulsifiée par un dispositif de mélange à cisaillement élevé. Une pré-émulsion est formée, ensuite, les ultrasons sont appliqués à l'aide d'une sonde en contact avec le liquide. La cavitation provoque la désintégration de la phase lipidique en gouttelettes plus petites (Fig. 38). La nanoémulsion chaude obtenue est ensuite refroidie pour

former les SLN (Svilenov and Tzachev, 2014). Les avantages de cette technique sont la possibilité de contrôler le processus en contrôlant l'amplitude de l'onde sonore, la disponibilité de l'équipement utilisé à l'échelle du laboratoire, la facilité de mise en œuvre ainsi qu'une bonne reproductibilité des résultats. Les inconvénients de cette technique sont la contamination potentielle par des métaux et l'instabilité physique telle que la croissance des particules lors du stockage (Eldem et al., 1991).

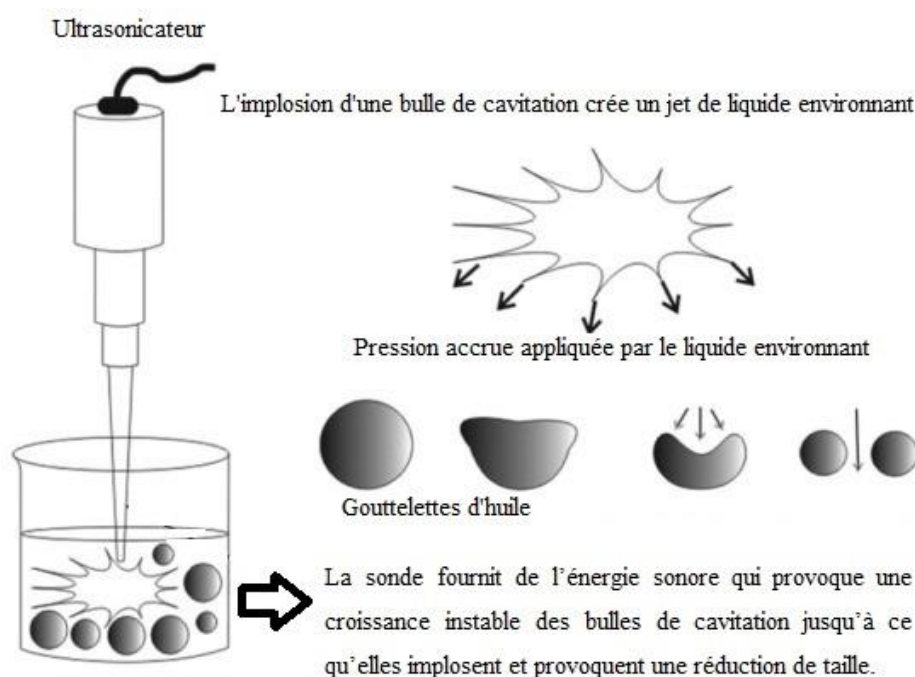


Fig. 38. Réduction de la taille des gouttelettes d'émulsion par ultrasons. (Adaptée de Singh et al., 2017).

3.8.3 Émulsification/Évaporation du solvant

Dans cette méthode, l'actif et le lipide sont dissous dans un solvant organique non miscible à l'eau (cyclohexane, dichlorométhane, toluène, chloroforme). L'émulsification est effectuée dans une phase aqueuse en utilisant un homogénéisateur à haute vitesse. Le solvant organique est évaporé par agitation à température ambiante formant une dispersion de nanoparticules par précipitation du lipide. Le lipide va précipiter pour former des SLN (Fig. 39).

L'avantage de cette méthode est d'éviter tout stress thermique, ce qui la rend appropriée pour l'incorporation de médicaments hautement thermolabiles. Un inconvénient évident est l'utilisation de solvant organique qui peut interagir avec l'actif et limiter la solubilité du lipide dans le solvant organique (Ekambaram et al., 2012; Sjöström and Bergenståhl, 1992).

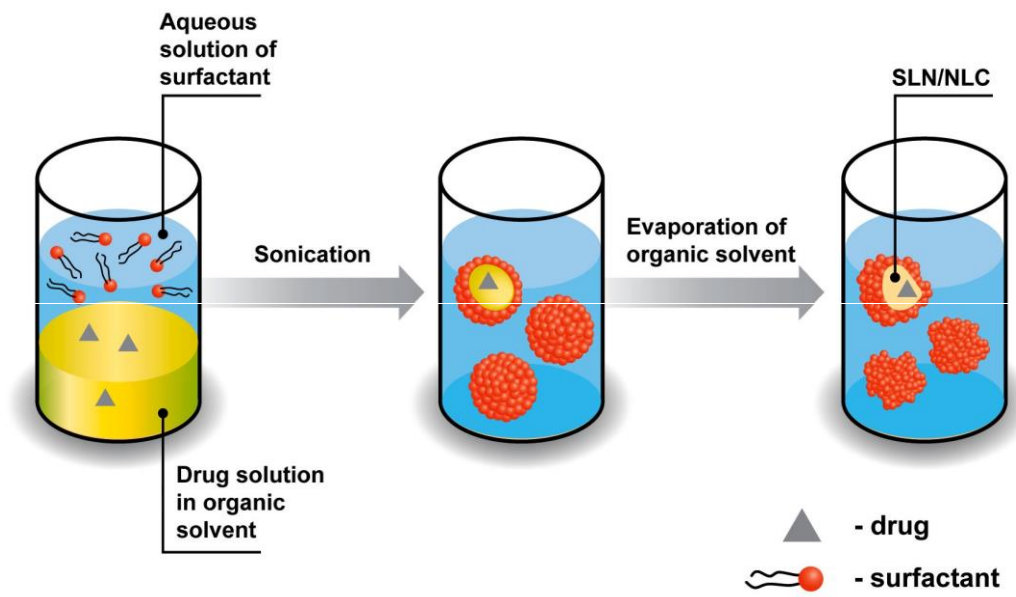


Fig. 39. Représentation schématique de la technique d'émulsification/évaporation de solvant pour la préparation des SLN (Svilenov and Tzachev, 2014).

3.9 Conclusion du chapitre 1

En résumé, les causes de la maladie d'Alzheimer sont à nos jours mal définies, d'où la nécessité d'adopter une approche non médicamenteuse basée sur la synergie des plantes médicinales, agissant à plusieurs niveaux selon un mode d'action de renforcement et de potentialisation pour obtenir une meilleure efficacité de la composition végétale.

La médecine traditionnelle Chinoise offre une variété de plantes ayant des propriétés biologiques intéressantes dans l'amélioration des fonctions cognitives. Une stratégie galénique innovante doit être étudiée pour assurer un bon transport de l'actif vers sa cible en traversant les différentes barrières biologiques notamment la barrière hémato-encéphalique (BHE). Les SLN sont une nouvelle génération de nanoparticules lipidiques qui constituent des systèmes prometteurs pour le ciblage des principes actifs vers le cerveau.

Elles ont gagné une attention accrue des industries pharmaceutiques et alimentaires en raison de leurs avantages potentiels tels que leur capacité à encapsuler des principes actifs hydrophobes, leur stabilité, la libération contrôlée du principe actif, la protection du principe actif contre la dégradation chimique et enzymatique et la possibilité de les produire à grande échelle.

Notre objectif dans cette étude, est de vectoriser un extrait végétal actif vers le cerveau en utilisant les SLN comme nanovecteurs. Pour cela, dans le chapitre suivant, nous allons tout d'abord évaluer les activités biologiques de l'extrait ainsi que sa caractérisation chimique, ensuite nous allons optimiser la formulation de l'extrait à l'aide des plans d'expériences.

CHAPITRE 2 - TRAVAUX PERSONNELS

Le deuxième chapitre présente l'étude expérimentale sur les différentes versions de l'extrait ; l'extraction des plantes, la caractérisation chimique, l'évaluation des activités biologiques in vitro/in vivo, l'optimisation de la composition en fonction de l'alimentarité des plantes et des résultats des tests in vitro.

Dans ce chapitre nous allons présenter l'étude expérimentale des différentes versions de l'extrait. Ce chapitre comporte 4 parties principales (Fig. 40) :

- La première partie traite l'extrait AT000, sa composition ainsi que l'évaluation des ses activités biologiques antioxydante, anti-inflammatoire et neuroprotectrice in vitro et in vivo. Les résultats sont présentés sous forme d'un article scientifique publié.
- La deuxième partie présente la modification apportée à l'extrait AT000 pour obtenir la première version alimentaire de l'extrait désigné par AT00X. les activités antioxydante, anti-inflammatoire et neuroprotectrice in vitro, ont été étudiées.
- La troisième partie de ce chapitre, étudie l'optimisation basée sur des plans d'expériences, de la composition de l'extrait AT00X en modifiant la quantité de chaque plante, dans le but d'améliorer l'activité antioxydante. Le nouvel extrait obtenu est désigné par AT33X. Les activités antioxydante et anti-inflammatoire ont été étudiées pour valider l'optimisation. À la suite d'un changement de la réglementation concernant l'alimentarité des plantes et l'autorisation de les utiliser dans les compléments alimentaires, nous avons modifié la composition de l'extrait AT33X en éliminant une plante, tout en gardant les proportions optimales des autres plantes. Cette nouvelle version optimale désigné par AT33B a subi les mêmes tests d'évaluation des activités antioxydante, anti-inflammatoire et neuroprotectrice in vitro et in vivo pour valider l'efficacité thérapeutique.
- La quatrième partie étudie la composition chimique des extraits AT00X et AT33B par chromatographie liquide et gazeuse.

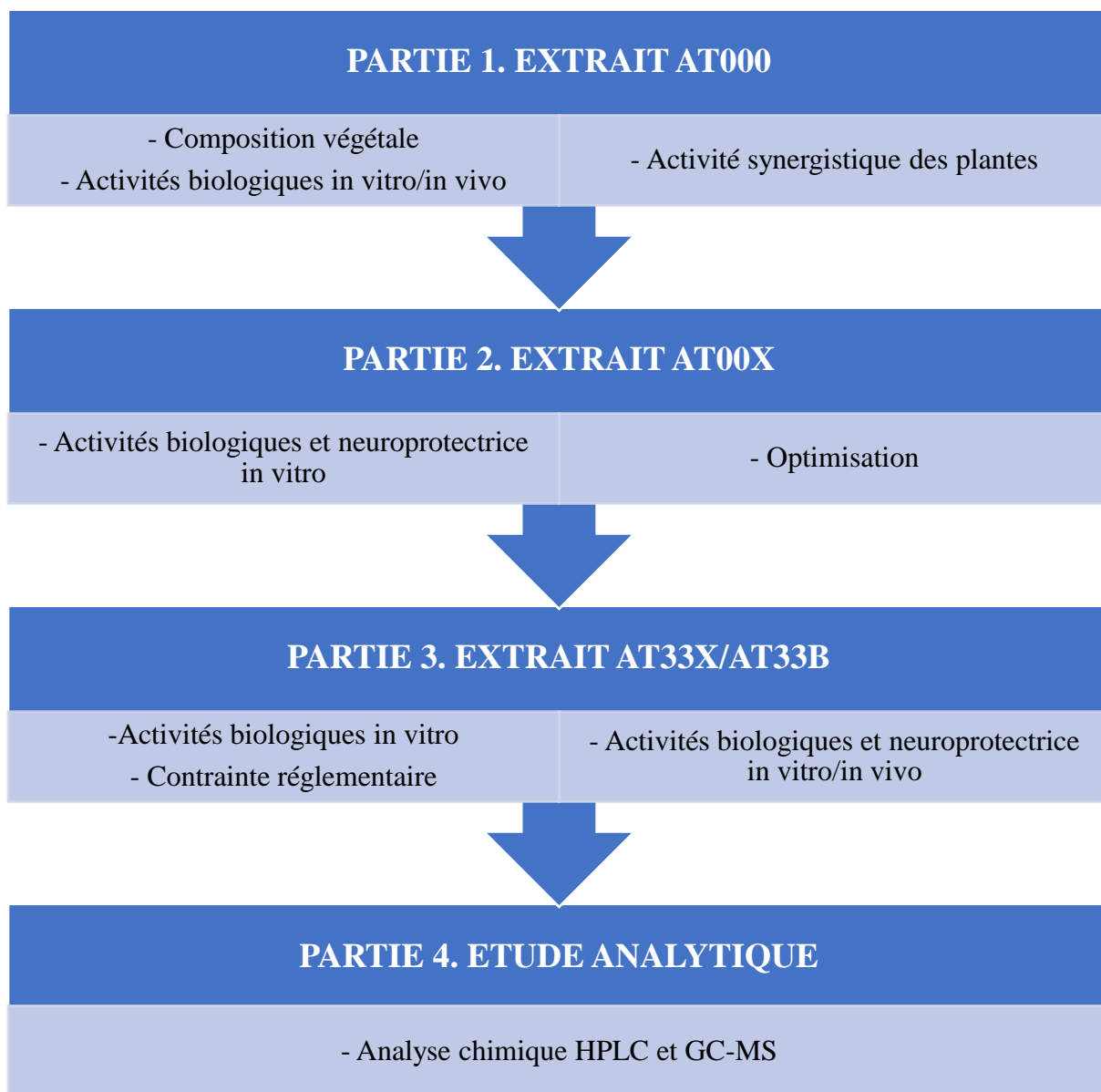


Fig. 40. Schéma résumant les 4 parties du chapitre 2.

4 PARTIE 1. EXTRAIT AT000

Le projet «THE BRAIN ESSENTIALS» vise à développer une nouvelle approche non conventionnelle des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (MA).

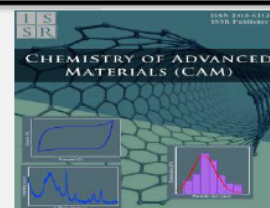
La première partie de l'étude a été réalisée pour évaluer l'activité neuroprotectrice d'un extrait de plantes (AT000) issu de la médecine traditionnelle chinoise, utilisé pour traiter l'épilepsie et les convulsions. Dans un premier temps, les activités antioxydante et anti-inflammatoire de l'extrait ont été évaluées. L'efficacité du composé sur l'atténuation des déficits d'apprentissage induits par le peptide toxique $A\beta_{25-35}$ (mémoire de travail spatiale et mémoire contextuelle à long terme) a été évaluée à la suite d'un traitement de 7 et 21 jours d'AT000 administré par voie orale. L'impact sur la peroxydation lipidique de l'hippocampe, indice du stress oxydatif, a également été évalué. Le traitement AT000 de 21 jours a atténué les déficits induits par l' $A\beta_{25-35}$, avec une prévention significative à la dose maximale testée (250 mg/kg/jour). Le traitement avec AT000 sur 21 jours a atténué l'augmentation de la peroxydation lipidique induite par $A\beta_{25-35}$, avec un blocage significatif et complet aux doses les plus élevées testées. Des expériences synergiques *in vivo*, ont montré que la présence de *Dryobalanops aromatica* et *Saussurea lappa* est cruciale pour obtenir un effet neuroprotecteur. Selon ces résultats, AT000 peut être un composé candidat dans le développement de médicaments thérapeutiques pour la prévention et le traitement de la MA.

4.1 Article publié

Les résultats de cette étude ont été publiés dans le journal : « Chemistry of Advanced Materials ».



Chemistry of Advanced Materials (CAM)

Journal homepage: <http://issrpublishing.com/cam/>

Original paper

Antioxidant, Anti-inflammatory and Neuroprotective Activities of a Plant Extract Derived from Traditional Chinese Medicine: SuHeXiang Wan (AT000)

Samy Iskandar ^{a,b,*}, Martial Senankpon Gnansounou ^{a,b,c}, Maxime Robin ^{a,b}, Jean Lorquin ^d,
Carole Di Giorgio ^b, Philippe Piccerelle ^{a,b}

^a Laboratoire de Pharmacie Galénique, Pharmacotechnie Industrielle, Biopharmacie et Cosmétologie, Faculté de Pharmacie, Aix Marseille Université, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, France

^b IMBE (Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et Continentale), UMR CNRS 7263, IRD 237, Faculté de Pharmacie, Aix Marseille Université, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, France

^c Laboratoire d'Etude et de Recherche en Chimie Appliquée, Ecole Polytechnique d'Abomey Calavi, Université d'Abomey Calavi, Bénin

^d Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), UM 110, CNRS/INSU, IRD, Aix Marseille Université, 13288 Marseille, France

Article Info:

Article history:

Received: 20 February 2018

Revised: 9 April 2018

Accepted: 14 April 2018

Available online: 5 June 2018

Keywords:

SuHeXiang Wan;
AT000; Alzheimer's disease;
Traditional Chinese medicine;
Amyloid beta;
Oxidative stress;
Inflammation.

*Corresponding author:

samy.iskandar@hotmail.com

Abstract

In this paper, we present SuHeXiang Wan, a medicine used in traditional Chinese medicine for the treatment of epilepsy and convulsions. We investigated the antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective activities of the same treatment designated as AT000. The synergy of the two plants, *Dryobalanops aromatica* and *Saussurea lappa*, of which the use in alimentary supplements is considered controversial, was evaluated for the first time. The antioxidant activity of the extract was assessed by DPPH and ORAC tests while the anti-inflammatory activity was determined by measuring the capacity of macrophages to generate a strong inflammatory response when stimulated with antigens, inducing NO release. The extract efficacy on the attenuation of the A β ₂₅₋₃₅-induced learning deficits (spatial working memory: spontaneous alternation in the Y-maze and contextual long-term memory: passive avoidance test) was evaluated *in vivo* in mice seven days after the peptide administration. The impact on lipid peroxidation in the hippocampus, an index of oxidative

stress, was also evaluated. AT000 extract showed a strong antioxidant activity at 2 mg/mL, 10 mg/mL and 301774 Trolox equivalents according to the DPPH and ORAC tests respectively. The 21-days AT000 treatment dose-dependently alleviated $A\beta_{25-35}$ -induced deficits, with significant prevention at the highest dose tested (250 mg/Kg/day) on the spontaneous alternation, step-through latency and escape latency parameter. 21-days AT000 treatment dose-dependently attenuated also $A\beta_{25-35}$ -induced increase lipid peroxidation, with a significant and complete blockade at the highest doses tested. Synergistic experiments showed that the presence of *Dryobalanops aromatica* and *Saussurea lappa* is crucial to obtain a neuroprotective effect. According to these results, AT000 could be a candidate compound in the development of therapeutic drugs for the prevention and treatment of Alzheimer's disease.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is an incurable neurodegenerative disease of cerebral tissue that leads to progressive and irreversible loss of mental functions and especially memory. It is the most common cause of dementia in humans [1]. AD is characterized by two primary lesions: senile plaques which are toxic extracellular aggregates of amyloid peptides and neurofibrillary tangles which are intracellular aggregates formed of pairs of helical filaments due to the abnormal formation of hyperphosphorylated tau protein masses [2]. The clinical symptoms of this disease include memory loss [3], especially recent events in the early phases of the disease and deterioration of other cognitive functions that interfere with mood, reasoning, judgment and language [4, 5].

From a histopathological point of view, abnormal cleavage by beta-secretase of amyloid precursor protein leads to the extracellular accumulation of neurotoxic peptide $A\beta_{42}$ generating senile plaques which compress neurons [6]. Oligomeric peptides $A\beta$ play a significant role in mediating neurotoxicity and leading to AD [7].

They provoke strong alterations of plasticity mechanisms leading to a decline in memory [8, 9].

Oligomers of $A\beta$ peptides vary in length between 40 and 43 amino acids. $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ are the most abundant species found in AD brains [10], however only the $A\beta_{42}$ fragment forms fibrillar deposits readily [11]. Another toxic minor fragment $A\beta_{25-35}$ has also been identified and used widely in research [12, 13]. $A\beta$ oligomers interact with the intracellular organelles responsible for the regulation of calcium homeostasis leading to oxidative stress and causing neuronal apoptosis [14]. $A\beta$ peptides can also provoke an inflammatory response in the brain and cytokine production by active astrocytes and microglia [15].

Several studies have shown the presence of lipids and proteins oxidation products in the tissues of Alzheimer's patients after death [16]. Further studies suggested the presence of a link between increased oxidative stress promoted by $A\beta$ and the presence of senile plaques [17].

Despite scientific advances in this field, at present, there is no effective treatment to inhibit the progression of the disease and stop the cognitive decline. Since brain lesions (amyloid plaques and

neurofibrillary degeneration) trigger a decrease in the neurotransmitter acetylcholine that allows neurons to communicate. Drug treatment options are currently limited to acetylcholine esterase inhibitors. Anticholinesterasics include three different molecules that have been rigorously tested and have proven to be effective in mild-to-moderate forms of the disease: Donepezil, Galantamine and Rivastigmine [18]. These treatments help to stabilize the disease, however; they do not reverse it nor cure it. In addition, these molecules can interact with a wide range of drugs and their consumption is associated with numerous side effects [19].

In non-drug therapies, to alleviate the symptoms of AD and improve cognitive functions, plants were used. The advantage of medicinal plants is their richness in compounds, which can act synergistically with other compounds from the same or another plant. plant-derived molecules can also boost the activity of the constituents or neutralize the toxic effects of compounds from other plant species [20]. Today, traditional Chinese medicine is a potential alternative to drug treatments. By testing different combinations of plants having potential neuroprotective activities, several studies in this field have shown that plant extracts derived from traditional Chinese medicine help fight against the symptoms of neurodegenerative diseases such as AD [21-24].

SuXeHiang Wan, an extract of 9 plants that have been used in the treatment of epilepsy and convulsions, has demonstrated a sedative and anticonvulsant effect as well as inhibitory effects on the central nervous system following the inhalation of its Essential oil [24]. In mice, the essential oil, SuXeHiang Wan, was shown to attenuate the amyloid beta-induced alteration of memory by inhibiting the phosphorylation of tau protein [25]. This extract contains an unlisted plant

in the French Pharmacopoeia (*Dryobalanops aromatica*) and another plant which its roots are declared in mutual recognition in the list B of French pharmacopoeia (*Saussurea lappa*). In the present study, the same extract designated as AT000 was evaluated for its antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities. We also investigated whether the oral administration of AT000 mixture can alleviate the pathology induced in mice injected intracerebroventricularly (i.c.v) with oligomeric amyloid- β_{25-35} peptide (A β_{25-35}). In addition, this study evaluated for the first time the synergistic effect of *Dryobalanops aromatica* and *Saussurea lappa* *in vivo*.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

All medicinal plants were purchased from GIVAUDAN Shanghai-China. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals (DPPH), N,O-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA), phosphate buffer, fluorescein, 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH), dimethyl sulfoxide (DMSO), Propyl gallate, Ascorbic acid, Griess modified reagent, Dexamethasone, RAW 264.7 cells, and Lipopolysaccharides (LPS) of *E.coli*, were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis USA). Trolox was obtained from Calbiochem (San Diego, United States), Dulbecco's modified Eagle Minimum Essential Medium (DMEM), Penicillin/streptomycin and inactivated calf serum were purchased from PAN BIOTECH. A β_{25-35} and scrambled amyloid- β protein (25-35) Sc.A β were purchased from Polypeptides (France).

2.2 Preparation of plant extract

AT000 was prepared as described previously with some modifications [24]. A total of 175 g of the mixture of *Liquidambar orientalis* (20 g),

Saussurea lappa (20 g), *Aquilaria agallocha* (15 g), *Santalum album* (20 g), *Boswellia carteri* (20 g), *Eugenia caryophyllata* (20 g), *Cyperus rotundus* (20 g), *Styrax benzoin* (20 g), and *Dryobalanops aromatica* (20 g), was pulverized and extracted once with 10 vol. of water/ethanol mixture (70:30, v/v) at 80-85 °C with reflux condenser for 3 hours. The extract was then vacuum filtered using a Büchner flask and evaporated using a rotary evaporator at 60 °C to give a sticky brown oil. To evaluate the impact of *Dryobalanops aromatica* and *Saussurea lappa*, we made 4 different extracts designed as AT formulations in the following manner:

AT001: *Dryobalanops aromatica*

AT002: *Dryobalanops aromatica* + *Saussurea lappa*

AT007: AT000 without *Dryobalanops aromatica* and *Saussurea lappa*

AT008: AT000 without *Dryobalanops aromatica*

2.3 Determination of radical scavenging activity

The radical scavenging activity of the extract was determined by measuring its ability to trap the stable free radical, DPPH as described by Brand-Williams *et al.* with some modifications [26]. Briefly, 0.05 mM solution of DPPH[•] was prepared in methanol, and 2.9 mL of this solution was added to 0.1 mL extract solution in methanol at different concentrations (from 0.2 to 10 mg/mL). The reaction mixture was stirred at room temperature in a dark chamber for 30 minutes, and the absorbance was recorded at 517 nm using a UV-Vis spectrophotometer (Ultrospec 3000 pro). Control was prepared by adding 2.9 mL of the DPPH solution (0.05 mM) to 0.1 mL of methanol. IC₅₀ values, which represent the concentration of the extract that causes neutralization of 50% of the DPPH radicals, were calculated from the percentage inhibition (PI, %) versus concentration

curve as Eq. (1). The inhibition of free radicals by DPPH (%) was calculated using the following equation:

$$PI(\%) = [1 - (A_1/A_0)] \times 100 \quad (1)$$

Where A₀ is the absorbance of the control reaction and A₁ is the absorbance in the presence of the sample. Trolox, ascorbic acid and propyl gallate were used as positive controls. Measurements were performed in triplicate, and the corresponding standard deviation was calculated.

2.4 Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay

The oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay was assessed in microplates as described by Ou *et al.* with some modifications [27]. The plant extract, AAPH, and fluorescein were diluted in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4). 25 µL of each extract (0.94-7.5 µg/mL) or phosphate buffer (blank) were mixed with 150 µL of fluorescein solution (8.21 x 10⁻⁵ mM) and incubated for 15 min at 37 °C. A volume of 25 µL of AAPH solution (153 mM final concentration) was added, and fluorescence was immediately monitored using an Infinite M200 TECAN plate fluorimeter at 2-min intervals for 90 min. the excitation and emission wavelengths used are 485 nm and 530 nm respectively. A calibration curve was performed with Trolox (0.4–12.5 µM) as standard. The ORAC values were calculated using the neat AUCs and expressed as µmol of Trolox equivalent per 100g of extract (µmol TE/100g). Trolox was used as a control standard.

2.5 Cell culture

Mouse macrophages cells (RAW 264.7) were maintained in DMEM with stable L-glutamine supplemented with Penicillin 100 IU/mL, streptomycin 100 µg/mL and 10% of inactivated calf serum at pH 7.2, freshly prepared, stored no longer than 3 weeks.

2.6 Anti-inflammatory and cytotoxicity assays

In vitro anti-inflammatory assay was determined by measuring the capacity of macrophages to generate a robust inflammatory response when stimulated with antigens, inducing NO release [28]. Cells were seeded into 48-well tissue culture plates at a concentration of 1.10^5 cells/mL (200 μ L/well) for 24 hours at 37 °C (5% CO₂). Then the culture medium was replaced by 200 μ L of medium containing the appropriate concentrations of AT000 extract, and cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/90% air for one hour. At the end of the incubation period, pro-inflammatory LPS from *E. coli* were added to cell cultures (1 μ g/mL), and cells were incubated under the same conditions for 24 hours. NO release was evaluated indirectly by measuring the accumulation of nitrite/nitrate, the stable end-products of NO oxidation, in the culture supernatant by the Griess reaction. 100 μ L of the supernatants were transferred into the wells of a 96-well tissue culture plate, and 100 μ L of the Griess modified reagent were added to each well. After 15-min at room temperature, the Optical Density (OD) of each well was read at 540 nm by a fluorescence-luminescence reader Infinite M200 Pro (TECAN). The results obtained for wells treated with AT000 extract were compared to those of untreated control wells (DMSO, 100% viability) and converted to percentage values.

In parallel to the assessment of NO release, cell viability was measured to validate the assay. The WST-1 vital dye reagent was used to measure cell mitochondrial respiration. For this purpose, the culture medium was decanted, and 100 μ L of WST-1 reagent (1/10 dilution) was added to each well. After a 30-min incubation period at 37 °C (5% CO₂), the Optical Density (OD) of each well was read at 450 nm by a fluorescence-luminescence

reader Infinite M200 Pro (TECAN). The results obtained for wells treated with AT000 extract were compared to those of untreated control wells (DMSO, 100% viability) and converted to percentage values. Experiments were performed in duplicate and dexamethasone was used as a positive control at the concentrations of 1, 5, 10, 50 and 100 μ M.

Inhibition of NO release and inhibition of cell viability were expressed as percentages as compared to the negative controls:

$$PI (\%) = 100 \times (OD_{\text{test well}} - OD_{\text{blank}}) / (OD_{\text{control}} - OD_{\text{blank}}) \quad (2)$$

The concentrations of the extract causing respectively a 50% decrease of NO release (IC_{50-NO-R}) and a 50% decrease of cell viability (IC_{50-cell-v}) were calculated through non-linear regression analysis using software TableCurve Version 2.0. The anti-inflammatory ratio corresponded to the ratio between the anti-inflammatory activity and the toxicity. It was expressed as follows:

$$\text{Anti-inflammatory ratio} = IC_{50\text{-cell-v}} / IC_{50\text{-NO-R}} \quad (3)$$

2.7 Animal studies

Male Swiss mice, six weeks old, weighing 30-35 g, from JANVIER (Saint Berthevin, France), were kept for housing. Experiments took place within the animal facility building of the University of Montpellier 2 (CECEMA, Office of Veterinary Services agreement # B- 34-172-23) for experiments 1-2 and in Amylgen (Regional Directorate of Food, Agriculture and Forest of Languedoc-Roussillon, agreement #A 34-169-002 from May 02, 2014) for experiments 3. Animals were housed in groups with access to food and water *ad libitum*, except during behavioral experiments. They were kept in a temperature and humidity controlled animal facility on a 12 h/12 h light/dark cycle (lights off at 07:00 pm). Mice were numbered by marking their tail using permanent

markers. All animal procedures were conducted in strict adherence to the European Union directive of September 22, 2010 (2010/63/UE).

2.7.1 Drugs and administration procedures

The homogeneous oligomeric preparation of A β ₂₅₋₃₅ peptide and scrambled A β ₂₅₋₃₅ peptide (Sc.A β) was performed according to the AMYLGEN's owned procedure. The preparations were dissolved in distilled sterile water at a concentration of 3 mg/mL and stored at -20 °C until use. Before injection, peptides were aggregated by incubation at 37 °C for 4 days. Each mouse was anesthetized with isoflurane 2.5% and injected i.c.v. with A β ₂₅₋₃₅ peptide (9 nmol/mouse) or Sc.A β peptide (9 nmol/mouse), in a final volume of 3 μ L per mouse, according to the previously described method [29-33].

Two administration procedures were examined. In experiment 1, AT000 was administered *per os* (p.o.) by gavage twice-a-day (b.i.d.), starting on the same day as A β ₂₅₋₃₅ and lasting until day 7 when the animals' behaviors were examined (7-days injection). In experiment 2, AT000 was administered *per os* by force-feeding twice-a-day (b.i.d.), starting 14 days before A β ₂₅₋₃₅ injection and lasting until day 7 when the animals' behaviors were examined (21-days injection). Finally, a third experiment was performed to analyze the impact of the two controversial plants in the extract: *Dryobalanops aromatica* and *Saussurea lappa*. This last experiment was performed at the active dose of the 21-days injection procedure.

2.7.2 Animals and treatment groups

- Two hundred and forty (240) male Swiss mice (30-35 g) were used.
- Twenty (20) groups of animals were constituted in the following manner:

Experiment 1 (groups 1-5):

- On day 0, Sc.A β or A β ₂₅₋₃₅-amyloid peptide was injected i.c.v. at 10:00 am.
- Between day 0 and day 9, AT000 or the vehicle 1 solution (DMSO 5% in water) was administered p.o. by force-feeding b.i.d., at 09:00 am and 05:00 pm. AT000 was administered only once at 09:00 am on day 9.

Experiment 2 (groups 6-10):

- Between day -14 and day 9, AT000 or the vehicle 1 solution (DMSO 5% in water) was administered p.o. by force-feeding b.i.d., at 09:00 am and 05:00 pm. AT000 was administered only once at 09:00 am on day 9.
- On day 0, Sc.A β or A β ₂₅₋₃₅-amyloid peptide was injected i.c.v. at 10:00 am.

Experiment 3 (groups 11-20):

- On day 0, Sc.A β or A β ₂₅₋₃₅-amyloid peptide was injected i.c.v. at 10:00 am.
- Between day -14 and day 9, AT000, AT001, AT002, AT007, AT008 or the vehicle solutions (vehicle 1 = DMSO 5% in water; vehicle 2 = DMSO 10% in grapeseed oil) was administered p.o. by force-feeding b.i.d., at 09:00 am and 05:00 pm.

Then, for all groups:

- On day 7, all animals were tested for the spontaneous alternation performance in the Y-maze test, an index of spatial working memory.
- On day 8 and 9, the contextual long-term memory of the animals was assessed using the step-through type passive avoidance procedure.
- On day 9, immediately after the retention session, animals were euthanized by decapitation and the hippocampus and cortex dissected out. Lipid peroxidation in the hippocampus was analyzed.

2.7.3 Formulation preparation

All solutions were freshly prepared twice a day before each injection as listed in Table 1. No

stock solution was prepared. Solutions were prepared from an initial concentrated solution in DMSO 100%. Then dilution was done in distilled water. Final DMSO concentration was 5%.

Groups 1, 2, 6, 7, 11, 12: vehicle 1 solution (DMSO 5% in water).

Groups 3, 8: AT000 6.2 mg/mL in vehicle 1 solution (corresponding to 37.5 mg/kg b.i.d. or 62.5 mg/kg/day).

Groups 4, 9: AT000 12.5 mg/mL in vehicle 1 solution (corresponding to 62.5 mg/kg b.i.d. or 125 mg/kg/day).

Groups 5, 10: AT000 25 mg/mL in vehicle 1 solution (corresponding to 125 mg/kg b.i.d. or 250 mg/kg/day).

Groups 14, 15: vehicle 5 solution (DMSO 10% in grapeseed oil plus emulsifier).

Group 16: AT000 25 mg/mL in vehicle 2 solution (corresponding to 125 mg/kg b.i.d. or 250 mg/kg/day).

Group 17: AT001 25 mg/mL in vehicle 2 solution (corresponding to 125 mg/kg b.i.d. or 250 mg/kg/day).

Table 1. Groups of animals, treatment period and number of mice used for different experiments.

Experiment	Groups of animals	Number of days	Number of mice
Experiment 1	1 Sc.A β + vehicle 1	7	12
	2 A β ₂₅₋₃₅ + vehicle 1	7	12
	3 A β ₂₅₋₃₅ + AT000: 62.5 mg/kg/day	7	12
	4 A β ₂₅₋₃₅ + AT000: 125 mg/kg/day	7	12
	5 A β ₂₅₋₃₅ + AT000: 250 mg/kg/day	7	12
Experiment 2	6 Sc.A β + vehicle 1	21	12
	7 A β ₂₅₋₃₅ + vehicle 1	21	12
	8 A β ₂₅₋₃₅ + AT000: 62.5 mg/kg/day	21	12
	9 A β ₂₅₋₃₅ + AT000: 125 mg/kg/day	21	12
	10 A β ₂₅₋₃₅ + AT000: 250 mg/kg/day	21	12
	11 Sc.A β + vehicle 1	21	12
	12 A β ₂₅₋₃₅ + vehicle 1	21	12
Experiment 3	13 A β ₂₅₋₃₅ + AT000 (in vehicle 1): 250 mg/kg/day	21	12
	14 Sc.A β + vehicle 2	21	12
	15 A β ₂₅₋₃₅ + vehicle 2	21	12
	16 A β ₂₅₋₃₅ + AT000 (in vehicle 2): 250 mg/kg/day	21	12
	17 A β ₂₅₋₃₅ + AT001: 250 mg/kg/day	21	12
	18 A β ₂₅₋₃₅ + AT002: 250 mg/kg/day	21	12
	19 A β ₂₅₋₃₅ + AT007: 250 mg/kg/day	21	12
	20 A β ₂₅₋₃₅ + AT008: 250 mg/kg/day	21	12

Group 18: AT002 25 mg/mL in vehicle 2 solution (corresponding to 125 mg/kg b.i.d. or 250 mg/kg/day).

Group 19: AT007 25 mg/mL in vehicle 2 solution (corresponding to 125 mg/kg b.i.d. or 250 mg/kg/day).

Group 20: AT008 25 mg/mL in vehicle 2 solution (corresponding to 125 mg/kg b.i.d. or 250 mg/kg/day).

2.7.4 Euthanization

At the end of the passive avoidance retention session, on day 9, animals were euthanized by decapitation. The hippocampi and frontal cortex were removed. One hippocampus of n=6 animals per group was used to measure lipid peroxidation levels in tissue extracts. The other hippocampus and the cortex were kept at -80 °C awaiting further analysis.

2.7.5 Spontaneous alternation performances

On day 7, all animals were tested for spontaneous alternation performance in the Y-maze, an index of spatial working memory. The Y-maze was made of grey polyvinylchloride. Each arm was 40 cm long, 13 cm high, 3 cm wide at the bottom, 10 cm wide at the top, and converging at an equal angle. Each mouse was placed at the end of one arm and allowed to move freely through the maze during an 8-min session. The series of arm entries, including possible returns into the same arm, was checked visually. An entry was defined as the penetration of the hind paws of the animal at least 2 cm into the arm. An alternation was defined as entries into all three arms on consecutive occasions. The number of maximum alternations was the total number of arm entries minus two and the percentage of alternation was calculated as: (actual alternations/maximum alternations) x 100. Parameters included the percentage of alternation (memory index) and the total number of arm entries (exploration index) [29-33].

2.7.6 Passive avoidance test

The apparatus is a two-compartment (15 x 20 x 15 cm high) box, one illuminated with white

polyvinylchloride walls and the other darkened with black polyvinylchloride walls and a grid floor. A guillotine door separates each compartment. A 60 W lamp positioned 40 cm above the apparatus lights up the white compartment during the experiment. Scrambled foot shocks (0.3 mA for 3 s) were delivered to the grid floor using a shock generator scrambler (Lafayette Instruments, Lafayette, USA). The guillotine door was initially closed during the training session. On day 8, during the training session, each mouse was placed in the white compartment. After 5 s, the door was raised. When the mouse entered the darkened compartment and placed all its paws on the grid floor, the door was closed and the foot shock delivered for 3 s. The step-through latency, that is, the latency spent to enter the darkened compartment, and the number of vocalizations was recorded. The retention test was carried out 24 h after training, on day 9. Each mouse was placed in the white compartment again. After 5 s, the door was raised. The step-through and escape latencies (corresponding to the re-exit from the darkened compartment) were recorded up to 300 s [31-33].

Animals that showed all latencies during the training and retention session lower than 10 s were considered as having failed to respond to the procedure and were discarded from the calculations. In this study, no animal was discarded accordingly.

2.7.7 Lipid peroxidation measures

At day 9, 6 mice from each group were euthanized by decapitation, and both hippocampi were rapidly removed, weighed and kept in liquid nitrogen until assayed. After thawing, one hippocampus per mice was homogenized in cold methanol (1/10 w/v), centrifuged at 1,000 g for 5 min and the supernatant placed in Eppendorf tube. The reaction volume of each homogenate was added to FeSO₄ 1 mM, H₂SO₄ 0.25 M, xylenol

orange 1 mM and incubated for 30 min at room temperature. After reading the absorbance at 580 nm (A_{5801}), 10 μ L of cumene hydroperoxide (CHP) 1 mM was added to the sample and incubated for 30 min at room temperature, to determine the maximal oxidation level. The absorbance was measured at 580 nm (A_{5802}). The level of lipid peroxidation was determined as CHP equivalents according to $CHPE = A_{5801}/A_{5802} \times [CHP \text{ (nmol)}]$ and expressed as CHP equivalents per mg of tissue and as a percentage of control group data (V-treated Sc.A β -administered mice).

2.7.8 Statistical analyses

All values, except passive avoidance latencies, were expressed as mean \pm S.E.M. Statistic analyses were performed on the different conditions using one-way ANOVA (F value), followed by the Dunnett's post-hoc multiple comparison tests. Passive avoidance latencies do not follow a Gaussian distribution since upper cut-off times were set. Therefore, they were analyzed using a Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA (H value), followed by a Dunn's multiple comparison tests. $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

3. Results and Discussion

3.1 Antioxidant activity

To determine the antioxidant potential of our extract, we evaluated the reducing power by the widely used DPPH test, and the ability to delay the oxidation of fluorescein by the ORAC assay. DPPH \cdot is a stable radical, nitrogen-centered and colored due to the delocalization of electron with a visible absorption maximum at 517 nm in an alcoholic solution. The reduction of the DPPH radical by the antioxidant compound is manifested by a decrease in the absorbance of the DPPH radical and by its discoloration (from violet to

yellow) [34]. The ORAC assay is currently considered the most relevant chemical test for measuring antioxidant activity since it is a dynamic test based on stress induced by peroxy radicals mimicking the cellular mechanisms induced by them [35, 36]. The DPPH scavenging effect of AT000 extract increased with increasing concentration of extract (Fig. 1), which demonstrated strong antioxidant ability at 2 mg/mL and 10 mg/mL (82.08 and 93.39%) respectively. Table 2 shows the antioxidative potency of AT000 extract compared with foods known to have substantial antioxidant activity (USDA Database for ORAC): Nutrient Data Laboratory, Agriculture Research Service, United States Department of Agriculture). AT000 extract exhibited a powerful antioxidant activity with a value of 301774 Trolox equivalents compared to the reference compounds.

This strong antioxidant activity is due to the richness of the plants constituting AT000 extract in phenolic compounds having the capacity to trap free radicals. Eugenol, the main component isolated from *Eugenia caryophyllata* possesses potent antioxidant properties [37, 38]. The ethanolic extract of *Liquidambar orientalis* leaves also showed a high antioxidant activity [39]. Ethyl acetate extract of *Aquilaria agallocha* have been reported to have free radical scavenging activity [40], and antioxidant properties *in vitro* at different concentrations by inhibition of nitrite-induced oxidation of hemoglobin in human blood hemolysate [41].

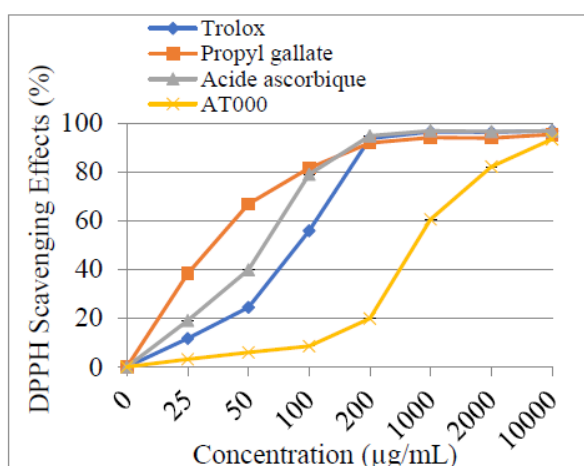


Figure 1. Free radical scavenging activity of methanol extract of AT000, trolox, propyl gallate, and ascorbic acid by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals.

Table 2. ORAC values of AT000 and foods expressed as µmol Trolox Eq. (µmol/100g)

Sample	Trolox Eq. (µmol/100 g)
AT000	301774
Ground cloves spice	290283
Indian gooseberry, dried	261500
Oregano spice, dried	175295
Rosemary spice, dried	165280
Cinnamon spice, ground	131420

Coumarins, tannins, and flavonoids isolated from *Cyperus rotundus* tuber extracts exhibited antibacterial, antioxidant, antimutagenic, cytotoxic and apoptotic properties [42, 43]. Cyanidin-3-glucoside, the primary pigment identified in *Santalum album* berries extract possessed antioxidant potentials and high scavenging activity [44]. This combination of molecules acts

synergistically to boost the overall antioxidant activity of the extract.

3.2 Anti-inflammatory and cytotoxicity assays

Anti-inflammatory activity and cytotoxicity of AT000 extract were tested *in vitro* and compared to dexamethasone as a positive control. The results are summarized in Table 3. AT000 showed the release of NO with IC_{50} value $< 20 \mu M$ on macrophages RAW 264.7 and exhibited cytotoxicity with IC_{50} value $> 50 \mu M$.

Aging is characterized by inflammation involved in the pathogenesis of all age-related diseases such as AD along with increased expression of inflammatory mediators [45]. this chronic inflammation is stimulated by $A\beta$ plaques and tangles [46]. The hallmark of the inflammatory state is the increase of serum levels of inflammatory mediators such as cytokines [47, 48], free radicals as reactive oxygen species and nitric oxide [49, 50]. AT000 extract showed an effective anti-inflammatory activity compared to dexamethasone, by inhibiting NO release from LPS-stimulated murine mouse macrophages RAW 264.7 cells and reduced LPS-induced cytotoxicity (Table 3). The plants constituting AT000 extract are rich in molecules with high anti-inflammatory properties; Eugenol has shown an anti-inflammatory activity by suppressing the expression of cyclooxygenase-2 in mouse macrophage cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS) [51]. *Aquilaria agallocha* oil demonstrated anti-inflammatory activity, thus significantly reducing edema in carrageenan-induced paw edema model [52]. Triterpene acids isolated from *Boswellia carteri* resin demonstrated potent anti-inflammatory activity in the mouse ear edema assay [53]. Delivery of *Boswellia* resin extract resulted in a dose-dependent inhibition of TH1 cytokines

coupled with a dose-dependent potentiation of TH2 cytokines indicating that purified mixture of BAS from *Boswellia carteri* plant resin exhibits carrier-dependent immunomodulatory properties *in vitro* [54]. Extract of rhizomes of *Cyperus rotundus* increased HO-1 expression in a concentration-dependent manner, which was correlated with significant inhibition of iNOS/NO production in LPS-activated RAW 264.7 cells [55]. α -Cyperone, the primary compound isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus*, inhibits LPS-induced COX-2 expression and PGE2 production through the negative regulation of NF κ B signalling in RAW 264.7 cells [56]. The (9R,10E)-9-hydroxy- α -santalal, a sesquiterpene isolated from *Santalum album* exhibited tumor-selective cytotoxicity against HL-60 cells [57]. Cyclosaplin, A new cyclic octapeptide purified from somatic seedlings of *Santalum album* L. exhibited cytotoxic activity against cultured human breast cancer (MDA-MB-231) cell line, by inducing apoptotic cell death by caspase 3 activation [58]. *Saussurea lappa* exhibited inhibitory effects on IL-8 Induction in Lipopolysaccharide-Activated Rat Macrophages [59]. Ethanolic extract of *Saussurea lappa* affects acute and chronic inflammation induced in mice and rats by inhibiting carrageenan-induced paw edema and preventing accumulation of inflammatory cells in carrageenan-induced peritonitis *in vivo* [60]. 'Dehydrocostus lactone', a sesquiterpene lactone from *Saussurea lappa* suppressed LPS-induced nitric oxide production [61] and inhibited release of TNF- α [62]. Another sesquiterpene lactone 'cynaropicrin' from *Saussurea lappa* inhibited TNF- α murine macrophage cell line and dose-dependently suppressed the proliferation of lymphocytes stimulated by Con-A [63]. Santamarin, a sesquiterpene lactone isolated from *Saussurea lappa*, represses LPS-induced inflammatory

responses via expression of heme oxygenase-1 in murine macrophage cells [64]. Borneol, the main component isolated from *Dryobalanops aromatica* inhibit nicotinic receptor-mediated catecholamine secretion in bovine adrenal chromaffin cells [65, 66]. All these properties add up to demonstrate the anti-inflammatory activity of AT000 extract.

3.3 AT000 extract recovers cognitive functions in A β ₂₅₋₃₅-treated mice

To determine the effective dose and the optimal injection time of the extract, the neuroprotective effect of AT000 was examined on the attenuation of the A β ₂₅₋₃₅-induced learning deficits according to two administration procedures (7-days and 21-days injection).

3.3.1 Spontaneous alternation performances

The spatial working memory was first examined by evaluating spontaneous alternation in the Y-maze test. As shown in Fig. 2a and 2c, the A β ₂₅₋₃₅ treatment induced highly significant spontaneous alternation deficits as compared to Sc.A β /V-injected mice. The 7-days AT000 treatment tended to attenuate the A β ₂₅₋₃₅-induced deficits, but no significant effect vs. A β ₂₅₋₃₅-treated animals was noted (Fig. 2a). No effect was noted on locomotion (Fig. 2b). On the other hand, the 21-days AT000 treatment prevented the A β ₂₅₋₃₅-induced deficits at the highest dose tested (250 mg/Kg/day) with a highly significant effect vs. the A β ₂₅₋₃₅ treated group (Fig. 2c). A mild effect was noted on locomotion since the ANOVA was significant, but no group effect was observed (Fig. 2d). Compared to 21-days pre-treatment, the daily injection of AT000 extract starting on the same day as A β ₂₅₋₃₅ injection and lasting 7 days after, reduced A β ₂₅₋₃₅-induced deficits at 250 mg/kg/day but without having a significant effect on spontaneous alteration in the Y-maze (Fig. 2a, b). This result

indicates that the extract acts according to a preventive way and not the curative way. In the case of a preventive treatment, the optimal effect was observed with increased treatment duration. The hypothesis is that the extract administered as a prolonged treatment induces a modification in the neurons, which makes the nervous system more

resistant and less sensitive to aggression by A β ₂₅₋₃₅-induced toxicity. Treatment for 21 days produces a more significant effect than 7 days treatment because it has more time to induce these modifications which are still poorly understood.

Table 3. Anti-inflammatory, cytotoxic activity and the anti-inflammatory ratio of AT000 and Dexamethasone.

	NO release IC ₅₀ (μM)	Toxicity IC ₅₀ (μM)	Anti-inflammatory ratio
AT000 (10 mg/mL)	1.06	> 50.00	> 47.00
Dexamethasone	4.31 ± 1.45 μM	163.22 ± 74.96 μM	37.87

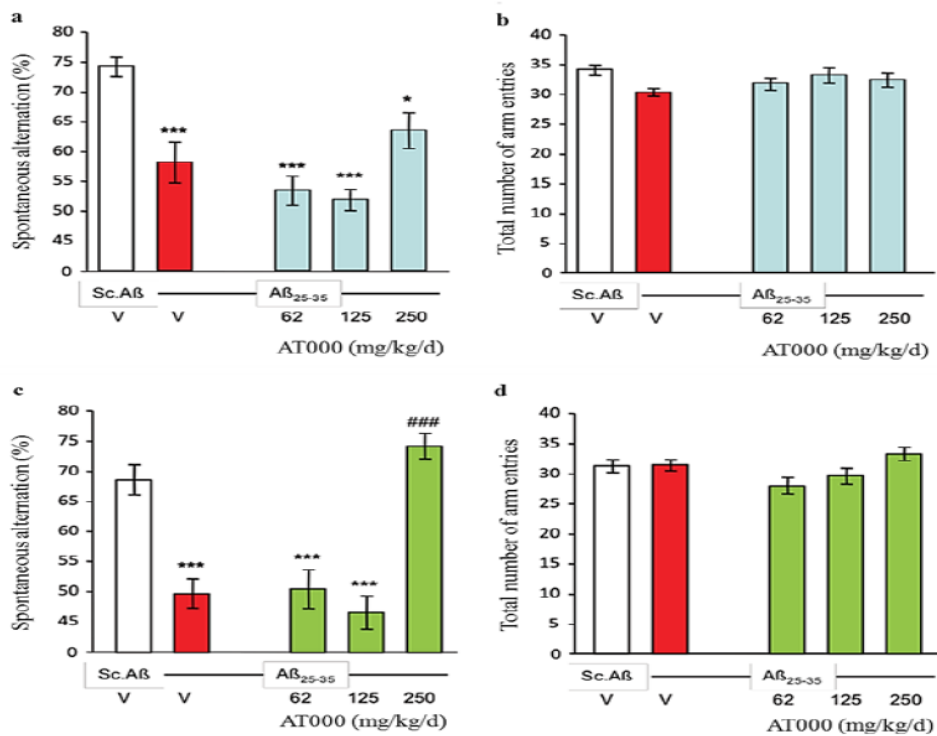


Figure 2. Effects of AT000 p.o. administration during 7 days (a, b) and 21 days (c, d) on A β ₂₅₋₃₅-induced spontaneous alternation deficits in mice. V, vehicle solution. *** p < 0.001, * p < 0.05 vs. the V-treated Sc.A β group; ### p < 0.001 vs. the A β ₂₅₋₃₅ treated group; Dunnett's test.

3.3.2 Step-through passive avoidance test

The contextual long-term memory was evaluated using the step-through passive avoidance test. The A β ₂₅₋₃₅ treatment led to highly significant passive avoidance deficits as compared to Sc.A β /V-injected mice, both regarding step-through latency (Fig. 3a, c) and escape latency (Fig. 3b, d) during the retention session. The 7-days AT000 treatment alleviated the A β ₂₅₋₃₅-induced deficits, with important prevention at the highest dose tested (250 mg/Kg/day) on the step-through latency parameter (Fig. 3a). However, the 21-days AT000 treatment dose-dependently alleviated the A β ₂₅₋₃₅-induced deficits, with a significant prevention at the highest dose tested (250 mg/Kg/day) on both the step-through latency (Fig. 3c) and escape latency parameter (Fig. 3d). Note that the treatments did not affect the step-through latency or shock sensitivity during the training session.

3.3.3 Lipid peroxidation measure

Lipid peroxidation, one of the essential biochemical parameters of amyloid toxicity, was also analyzed in the hippocampus to validate the neuroprotective activity of the extract. According to the 7-days AT000 injection procedure, A β ₂₅₋₃₅ treatment induced highly significant increase (+87%) in lipid peroxidation in the hippocampus, as compared to Sc.A β /V-injected mice (Fig. 4a). The 7-days AT000 treatment dose-dependently attenuated the A β ₂₅₋₃₅-induced increase, with a significant effect at the two highest doses tested (125 and 250 mg/Kg/day) (Fig. 4a). At 250 mg/kg/day, the lipid peroxidation level remained significantly higher than Sc.A β /V-injected mice (+29%). According to the 21-days AT000 injection procedure, A β ₂₅₋₃₅ treatment induced highly significant increase (+33%) in the level of peroxidized lipids in the hippocampus, as compared to Sc.A β /V-injected mice (Fig. 4b). The

21-days AT000 treatment dose-dependently attenuated the A β ₂₅₋₃₅-induced increase, with a significant and complete blockage at the highest doses tested (Fig. 4b).

The pre-treatment by oral administration of AT000 extract for 21 days, alleviated the pathology induced intracerebroventricularly in mice and showed significant activity on the attenuation of A β ₂₅₋₃₅-induced learning deficits, with a highly significant effect at 250 mg/kg/day (Fig. 2, 3, 4). This neurotoxic peptide leads to cognitive and behavioral disorders including spatial working memory and contextual long-term memory, as well as biochemical modifications such as lipid peroxidation. The effect inducing concentration of AT000 extract was significantly higher than the previously reported concentration for Amino-tetrahydrofuran derivative ANAVEX1-41 [10 μ g/kg; [32]. However, ANAVEX1-41 was administered intraperitoneally suggesting that the mode of administration plays a role in determining the effective dose. Koo *et al.* and Jeon *et al.* studied the effect of SuHeXiang essential oil on attenuation of amyloid-beta-induced alteration of memory. However, their studies did not report an effective dose [24, 25]. On the other hand, oral administration in the present study showed an advantage over inhalation for the determination of an active dose of this extract *in vivo* for the first time.

3.4 Experiment 3 (Evaluation of synergy)

In this experiment, we evaluated the impact of *Dryobalanops aromatica* and *Saussurea lappa* in the composition to demonstrate synergy between the different plants constituting the AT000 extract. For this, we prepared 4 extracts by eliminating these two plants. We evaluated the neuroprotective effect of these 4 extracts on the attenuation of A β ₂₅₋₃₅-induced learning deficits first with spatial working memory: spontaneous alternation in the Y-

maze and contextual long-term memory: passive avoidance test. The impact of these extracts on lipid peroxidation in the hippocampus was also

evaluated. This last experiment was performed at the active dose of the 21-days injection procedure.

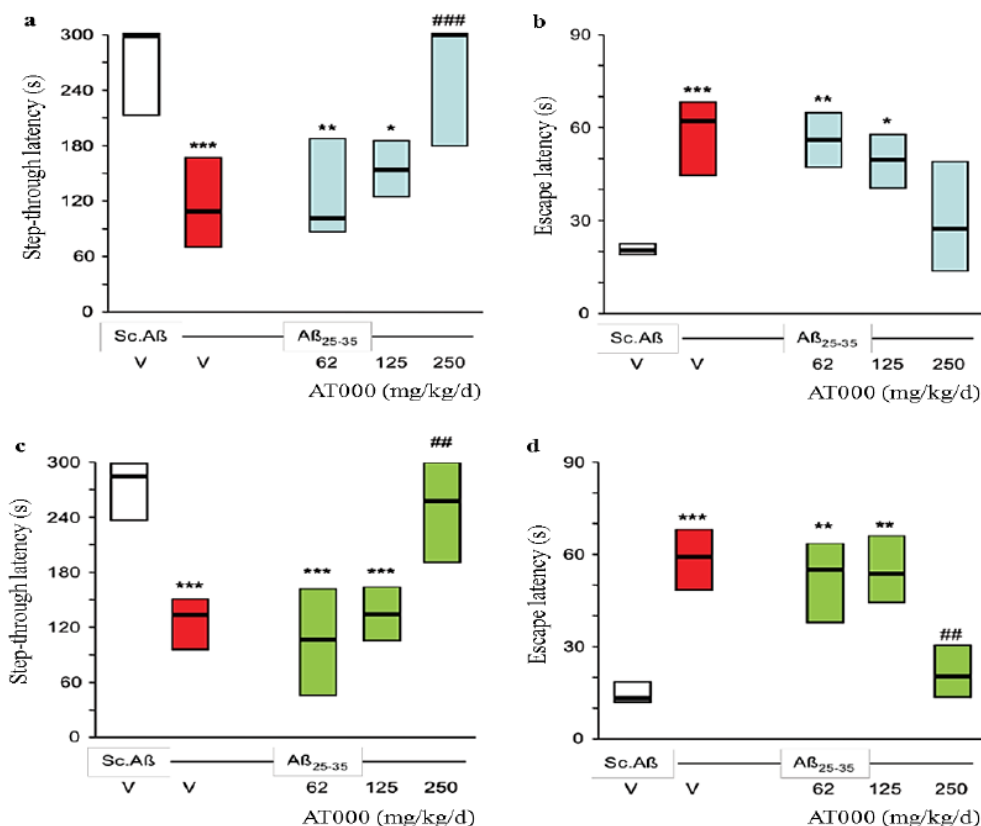


Figure 3. Effects of AT000 administration during 7 days (a, b) and 21 days (c, d) on Aβ₂₅₋₃₅-induced passive avoidance deficits in mice: (a, c) step-through latency and (b, d) escape latency measured during the retention session. V, vehicle solution. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs. the V-treated Sc.Aβ group; ## p < 0.01, ### p < 0.001 vs. the Aβ₂₅₋₃₅-treated group; Dunn's test.

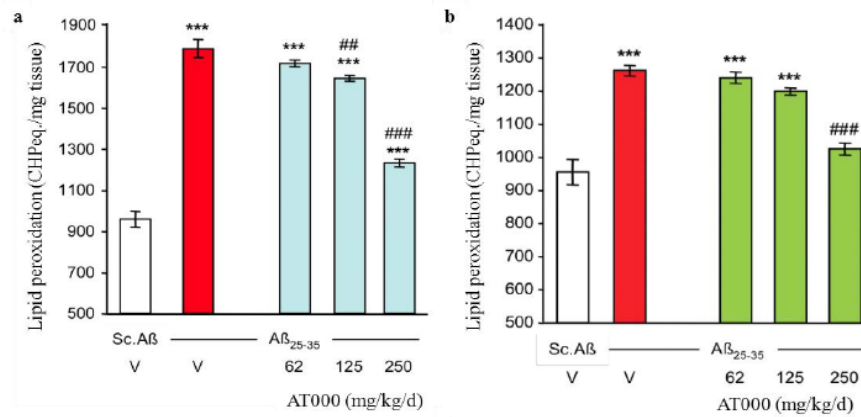


Figure 4. Effects of AT000 administration during 7 days (a) and 21 days (b) on Aβ₂₅₋₃₅-induced increase in lipid peroxidation in the mouse hippocampus. V, vehicle solution. *** p < 0.001 vs. the V-treated Sc.Aβ group; ## p < 0.01, ### p < 0.001 vs. the Aβ₂₅₋₃₅-treated group; Dunn's test.

3.4.1 Spontaneous alternation performances

Spontaneous alternation in the Y-maze was evaluated first, as shown in Fig. 5a and 5b. Aβ₂₅₋₃₅ treatment induced highly significant spontaneous alternation deficits as compared to Sc.Aβ/V-injected mice. The AT000 treatment blocked the Aβ₂₅₋₃₅-induced deficit, when solubilized in

Vehicle 1 solution (Fig. 5a) as well as in-vehicle 2 solution (Fig. 5b). Neither the 1 or 2 plants formulations (AT001 or AT002) or the remaining 7 or 8 plants formulations (AT007, AT008) affected the Aβ₂₅₋₃₅-induced alternation deficit (Fig. 5b). No effect was noted on locomotion.

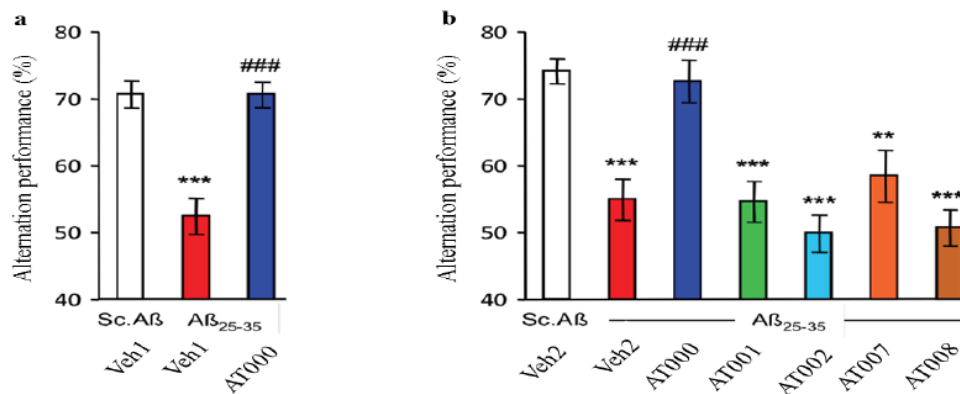


Figure 5. Comparative effects of *Dryobalanops aromatica*, *Saussurea lappa* and AT formulations p.o. administration during 21 days on Aβ₂₅₋₃₅-induced spontaneous alternation deficits in mice. Veh1, vehicle 1 solution (DMSO 5% in water); Veh2, vehicle 2 solution (DMSO 10% in grapeseed oil). *** p < 0.001, ** p < 0.01 vs. the V-treated Sc.Aβ group; ### p < 0.001 vs. the V-treated Aβ₂₅₋₃₅ group; Dunnett's test.

3.4.2 Step-through passive avoidance test

The contextual long-term memory was evaluated using the step-through passive avoidance test. A β ₂₅₋₃₅ treatment induced highly significant passive avoidance deficits as compared to Sc.A β /V-injected mice, both regarding step-through latency (Fig. 6a, c) or escape latency (Fig. 6b, d). AT000 treatment blocked the A β ₂₅₋₃₅-induced deficits

when solubilized in Vehicle 1 solution (Fig. 6a, c) as well as in-vehicle 2 solution (Fig. 6b, d). Neither the 1 or 2 plants formulations (AT001 or AT002) or the remaining 7 or 8 plants formulations (AT007, AT008) affected the A β ₂₅₋₃₅-induced passive avoidance deficits, both in terms of step-through latency (Fig. 6a, c) or escape latency (Fig. 6b, d).

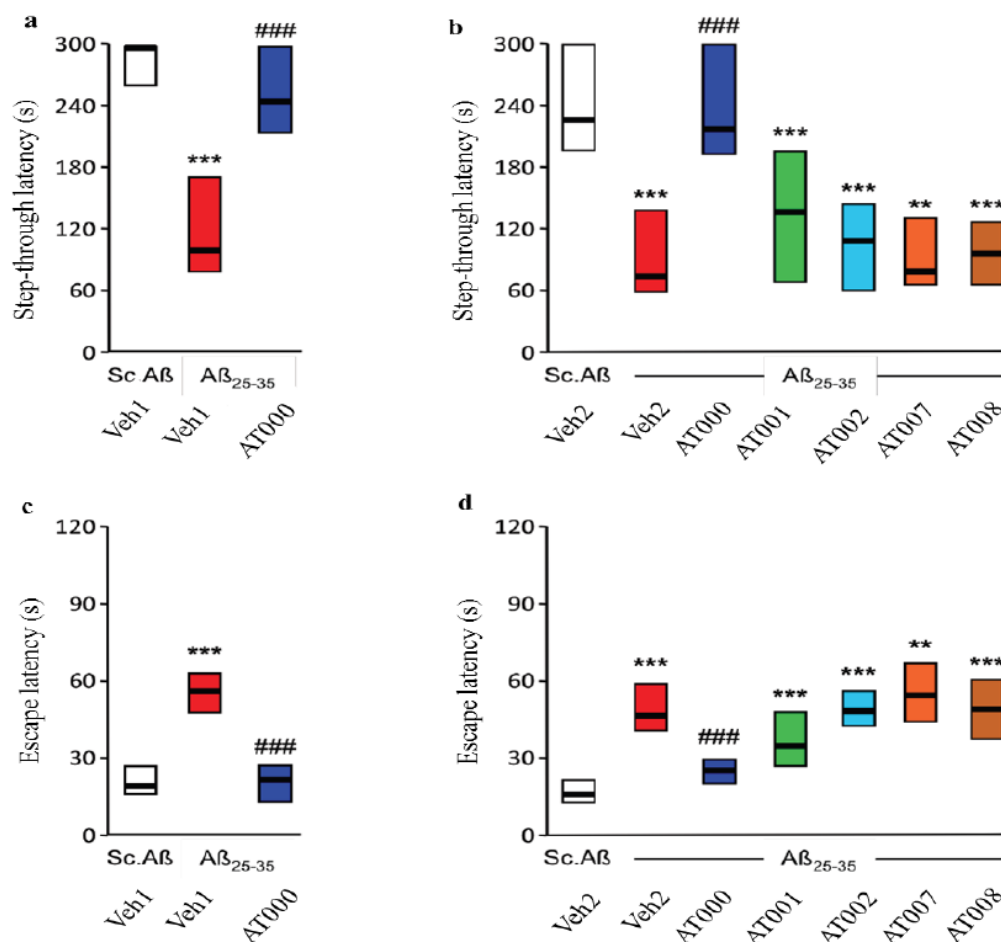


Figure 6. Comparative effects of *Dryobalanops aromatica*, *Saussurea lappa* and AT formulations on A β ₂₅₋₃₅-induced passive avoidance deficits in mice: (a) step-through latency and (b) escape latency measured during the retention session. Veh1, vehicle 1 solution (DMSO 5% in water); Veh2, vehicle 2 solution (DMSO 10% in grapeseed oil). ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs. the V-treated Sc.A β group; ### p < 0.001 vs. the A β ₂₅₋₃₅-treated group; Dunn's test.

3.4.3 Lipid peroxidation measure

Finally, we evaluated lipid peroxidation, an index of oxidative stress. The A β ₂₅₋₃₅ treatment induced highly significant increase (+44%) in lipid peroxidation in the hippocampus, as compared to Sc.A β /V-injected mice in Veh1 conditions (Fig. 7a) and a highly significant increase (+63%) in lipid peroxidation in the hippocampus, as compared to

Sc.A β /V-injected mice in Veh2 conditions (Fig. 7a). AT000 treatment blocked the A β ₂₅₋₃₅-induced increase highly significantly as compared to A β ₂₅₋₃₅/V-treated mice in both vehicle conditions (Fig. 7a, b). Neither the 1 nor 2 plants formulations (AT001 or AT002) or the remaining 7 or 8 plants formulations (AT007, AT008) affected the A β ₂₅₋₃₅-induced increase in lipid peroxidation (Fig. 7b).

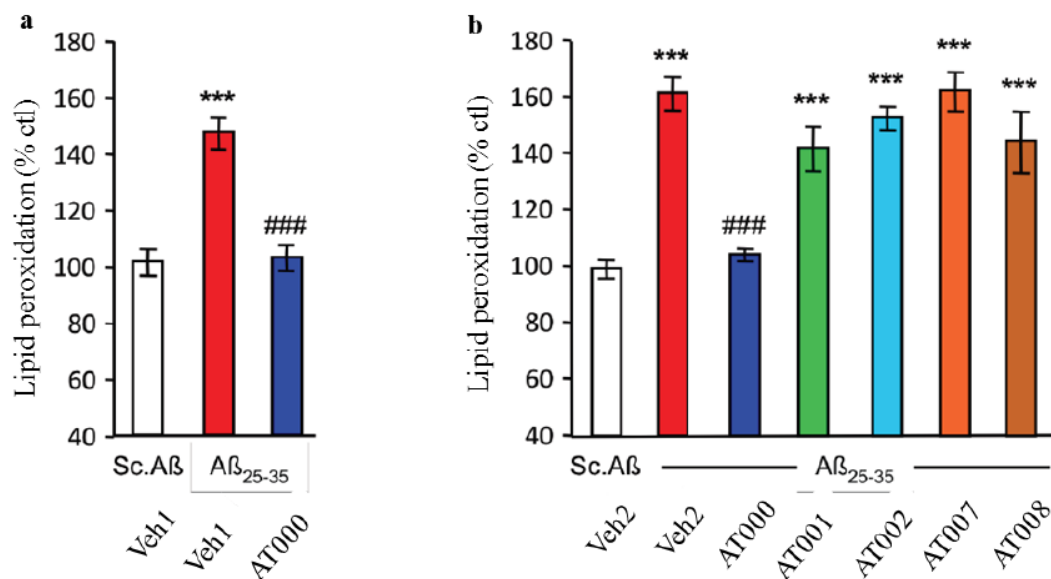


Figure 7. Comparative effects of *Dryobalanops aromatica*, *Saussurea lappa*, and AT formulations p.o. administration during 21 days on A β ₂₅₋₃₅-induced increase in lipid peroxidation in the mouse hippocampus. Veh1, vehicle 1 solution (DMSO 5% in water); Veh2, vehicle 2 solution (DMSO 10% in grapeseed oil). *** p < 0.001; ### p < 0.001 vs. the V-treated A β ₂₅₋₃₅ group; Dunnett's test.

The synergistic effect of *Dryobalanops aromatica* and *Saussurea lappa* was evaluated. For this purpose, 4 different extracts were prepared to study the impact on the overall activity of the extract. The 4 extracts were tested on spatial working memory, contextual long-term memory and lipid peroxidation at the active dose (250 mg/kg/day) and 21-days treatment. The results obtained showed that the elimination of these

plants from the extract led to the total disappearance of the neuroprotective activity (Fig. 5, 6, 7). The results also showed that *Dryobalanops aromatica* and *Saussurea lappa* alone do not show any neuroprotective activity. The activity is due to the combination of these 9 plants which, by extracting them together, will interact according to the potentiation and the effect will be boosted. Additionally, the two controversial plants were

found to be essential for the neuroprotective activity of the extract.

The mechanisms of action of the plants constituting AT000 extract have been previously studied. Essential oil of *Eugenia caryophyllata* possesses anticonvulsant activity against maximal electroshock (MES)-induced tonic seizures in male mice [67]. *Liquidambar orientalis* has also been reported to have anticonvulsant and sedative properties by substantially delaying the appearance of PTZ-induced convulsion [68]. Aqueous extract of *Aquilaria agallocha* stems showed inhibitory effects on histamine release from rat peritoneal mast cells leading to inhibition of immediate hypersensitivity reactions [69]. Benzylacetone, α -gurjunene and calarene, principles volatile obtained from Agarwood oil showed sedative activity in mice using a system of spontaneous vapor administration [70]. Alcoholic extract of *Aquilaria agallocha* (AEAA) has anticonvulsant activity using PTZ (Pentylentetrazole) to induced convulsion. At a higher dose, an AEAA showed a significant anticonvulsant effect by increasing latency of clonus, an onset of tonic seizures and declined mortality of mice [71]. *Cyperus rotundus* tubers extract attenuated significantly learning and memory disturbance in passive avoidance paradigm and spatial cognitive deficit in Morris water maze produced by lesioning of the NBM in rats [72]. *Cyperus rotundus* tubers extract treatment showed therapeutic potential in aging and age-related neurodegenerative disorders by preventing the cognitive impairments significantly following NBM lesion [72]. Pre-treatment of neurons with *Cyperus rotundus* extract ameliorates the mitochondrial and plasma membrane damage induced by SIN-1, restores the cellular morphology and improves the antioxidant status by regulating the oxidative stress biomarkers [73]. Total oligomeric flavonoids (TOFs) extracted from

Cyperus rotundus demonstrated neuroprotective effect against the ischemic–reperfusion, induced neurodegeneration in the rat model by reducing oxidative stress, excitotoxicity, neurological and behavioral alterations [74]. Pre-treatment with an alcoholic extract of *Saussurea lappa* roots increased latency and also reduced mortality rate which indicates anticonvulsant property against Pentylentetrazole and picrotoxin-induced convulsions in mice [75].

4. Conclusions

Our results demonstrated that AT000 extract has a significant neuroprotective effect on the attenuation of the $A\beta_{25-35}$ -induced learning deficits and lipid peroxidation in the hippocampus. The extract also showed an effective antioxidant and anti-inflammatory activities, which indicates that AT000 extract has potential as a potent therapeutic agent for neuroprotection and prevention of AD. We are continuing studies on the AT000 extract to better understand the synergy mechanisms between the different plants in the mixture as well as chemical composition of AT000 extract. For that the analytical study part including the chemical composition of the plants is crucial.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgments

The study was supported by AROMA THERAPEUTICS and LAPHAL industries in France. We are grateful to Mr. Laurent MOY from AROMA THERAPEUTICS and Mr. Druon NOTE from LAPHAL industries for their contribution to funding and supporting of this research project work.

References

- [1] V. Lahmy, R. Long, D. Morin, V. Villard, T. Maurice, Mitochondrial protection by the mixed muscarinic/ σ 1 ligand ANAVEX2-73, a tetrahydrofuran derivative, in A β 25–35 peptide-injected mice, a nontransgenic Alzheimer's disease model, *Frontiers in Cellular Neuroscience* **8** (2015) 1-11.
- [2] H. Thonberg, H.-H. Chiang, L. Lilius, C. Forsell, A.-K. Lindström, C. Johansson, J. Björkström, S. Thordardottir, K. Slegers, C. Van Broeckhoven, A. Rönnbäck, C. Graff, Identification and description of three families with familial Alzheimer disease that segregate variants in the SORL1 gene, *Acta Neuropathologica Communications* **5**(1) (2017) 43-55.
- [3] A. E. Budson, B. H. Price, Memory dysfunction, *The New England Journal of Medicine* **352**(7) (2005) 692-699.
- [4] I. Chumakov, S. Nabirovichkin, N. Cholet, A. Milet, A. Boucard, D. Toulorge, Y. Pereira, E. Gaudens, S. Traoré, J. Fouquier, M. Guedj, E. Vial, N. Callizot, R. Steinschneider, T. Maurice, V. Bertrand, C. Scart-Grès, R. Hajj, D. Cohen, Combining two repurposed drugs as a promising approach for Alzheimer's disease therapy, *Scientific Reports* **5** (2015) 7608-7620.
- [5] R. Katzman, Alzheimer's disease, *The New England Journal of Medicine* **314**(15) (1986) 964-973.
- [6] D. J. Selkoe, Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases, *Nature Cell Biology* **6**(11) (2004) 1054-1061.
- [7] J. Hardy, D. J. Selkoe, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science (New York, N.Y.)* **297**(5580) (2002) 353-356.
- [8] S. Barghorn, V. Nimmrich, A. Striebinger, C. Krantz, P. Keller, B. Janson, M. Bahr, M. Schmidt, R. S. Bitner, J. Harlan, E. Barlow, U. Ebert, H. Hillen, Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease, *Journal of Neurochemistry* **95**(3) (2005) 834-847.
- [9] M. Townsend, G. M. Shankar, T. Mehta, D. M. Walsh, D. J. Selkoe, Effects of secreted oligomers of amyloid β -protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers, *The Journal of Physiology* **572**(Pt 2) (2006) 477-492.
- [10] D. J. Selkoe, D. Schenk, Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **43** (2003) 545-584.
- [11] D. J. Selkoe, Molecular pathology of amyloidogenic proteins and the role of vascular amyloidosis in Alzheimer's disease, *Neurobiology of Aging* **10**(5) (1989) 387-395.
- [12] M. A. Gruden, T. B. Davidova, M. Malisaukas, R. D. E. Sewell, N. I. Voskresenskaya, K. Wilhelm, E. I. Elistratova, V. V. Sherstnev, L. A. Morozova-Roche, Differential neuroimmune markers to the onset of Alzheimer's disease neurodegeneration and dementia: autoantibodies to A β 25-35 oligomers, S100b and neurotransmitters, *Journal of Neuroimmunology* **186**(1-2) (2007) 181-192.
- [13] T. Kubo, S. Nishimura, Y. Kumagae, I. Kaneko, In vivo conversion of racemized beta-amyloid ([D-Ser 26]A β 1-40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser 26]A β 25-35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients, *Journal of Neuroscience Research* **70**(3) (2002) 474-483.

- [14] A. Y. Abramov, L. Canevari, M. R. Duchon, Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase, *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **24**(2) (2004) 565-575.
- [15] R. C. Frederickson, Astroglia in Alzheimer's disease, *Neurobiology of Aging* **13**(2) (1992) 239-253.
- [16] D. A. Butterfield, D. Boyd-Kimball, Amyloid beta-peptide(1-42) contributes to the oxidative stress and neurodegeneration found in Alzheimer disease brain, *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* **14**(4) (2004) 426-432.
- [17] H. A. Jung, T. Yokozawa, B.-W. Kim, J. H. Jung, J. S. Choi, Selective inhibition of prenylated flavonoids from *Sophora flavescens* against BACE1 and cholinesterases, *The American Journal of Chinese Medicine* **38**(2) (2010) 415-429.
- [18] J. Misik, J. Korabecny, E. Nepovimova, P. Cabelova, J. Kassa, The effects of novel 7-MEOTA-donepezil like hybrids and N-alkylated tacrine analogues in the treatment of quinuclidinyl benzilate-induced behavioural deficits in rats performing the multiple T-maze test, *Biomedical Papers* **159**(4) (2015) 547-553.
- [19] R. Cacabelos, Donepezil in Alzheimer's disease: From conventional trials to pharmacogenetics, *Neuropsychiatric Disease and Treatment* **3**(3) (2007) 303-333.
- [20] M.-J. R. Howes, P. J. Houghton, Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function, *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **75**(3) (2003) 513-527.
- [21] M. Adams, F. Gmünder, M. Hamburger, Plants traditionally used in age related brain disorders--a survey of ethnobotanical literature, *Journal of Ethnopharmacology* **113**(3) (2007) 363-381.
- [22] M. Ayaz, A. Sadiq, M. Junaid, F. Ullah, F. Subhan, J. Ahmed, Neuroprotective and anti-aging potentials of essential oils from aromatic and medicinal plants, *Frontiers in Aging Neuroscience* **9** (2017) 1-16.
- [23] Z. Lin, J. Gu, J. Xiu, T. Mi, J. Dong, J. K. Tiwari, Traditional Chinese Medicine for Senile Dementia, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012** (2012) 1-13.
- [24] B.-S. Koo, S.-I. Lee, J.-H. Ha, D.-U. Lee, Inhibitory effects of the essential oil from SuHeXiang Wan on the central nervous system after inhalation, *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **27**(4) (2004) 515-519.
- [25] S. Jeon, J. Hur, H. J. Jeong, B.-S. Koo, S. C. Pak, SuHeXiang Wan essential oil alleviates amyloid beta induced memory impairment through inhibition of tau protein phosphorylation in mice, *The American Journal of Chinese Medicine* **39**(5) (2011) 917-932.
- [26] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food Science and Technology* **28**(1) (1995) 25-30.
- [27] B. Ou, M. Hampsch-Woodill, R. L. Prior, Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**(10) (2001) 4619-4626.
- [28] E. Garayev, G. Herbette, C. Di Giorgio, P. Chiffolleau, D. Roux, H. Sallanon, E. Ollivier, R. Elias, B. Baghdikian, New sesquiterpene

- acid and inositol derivatives from *Inula montana* L, *Fitoterapia* **120** (2017) 79-84.
- [29] T. Maurice, B. P. Lockhart, A. Privat, Amnesia induced in mice by centrally administered β -amyloid peptides involves cholinergic dysfunction, *Brain Research* **706**(2) (1996) 181-193.
- [30] T. Maurice, T. P. Su, A. Privat, Sigma 1 (σ 1) receptor agonists and neurosteroids attenuate B25-35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism, *Neuroscience* **83**(2) (1998) 413-428.
- [31] J. Meunier, J. Ieni, T. Maurice, Antiamnesic and neuroprotective effects of donepezil against learning impairments induced in mice by exposure to carbon monoxide gas, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **317**(3) (2006) 1307-1319.
- [32] V. Villard, J. Espallergues, E. Keller, T. Alkam, A. Nitta, K. Yamada, T. Nabeshima, A. Vamvakides, T. Maurice, Antiamnesic and neuroprotective effects of the aminotetrahydrofuran derivative ANAVEX1-41 against amyloid beta(25-35)-induced toxicity in mice, *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **34**(6) (2009) 1552-1566.
- [33] V. Villard, J. Espallergues, E. Keller, A. Vamvakides, T. Maurice, Anti-amnesic and neuroprotective potentials of the mixed muscarinic receptor/sigma 1 (σ 1) ligand ANAVEX2-73, a novel aminotetrahydrofuran derivative, *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)* **25**(8) (2011) 1101-1117.
- [34] M. N. Alam, N. J. Bristi, M. Rafiquzzaman, Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity, *Saudi Pharmaceutical Journal* **21**(2) (2013) 143-152.
- [35] R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(10) (2005) 4290-4302.
- [36] N. P. Seeram, M. Aviram, Y. Zhang, S. M. Henning, L. Feng, M. Dreher, D. Heber, Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(4) (2008) 1415-1422.
- [37] K. Chaieb, H. Hajlaoui, T. Zmantar, A. B. Kahla-Nakbi, M. Rouabhia, K. Mahdouani, A. Bakhrouf, The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (Syzgium aromaticum L. Myrtaceae): a short review, *Phytotherapy Research* **21**(6) (2007) 501-506.
- [38] İ. Gülçin, İ. Güngör Şat, Ş. Beydemir, M. Elmastaş, Ö. İrfan Küfrevioğlu, Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.), *Food Chemistry* **87**(3) (2004) 393-400.
- [39] N. Saraç, B. Şen, Antioxidant, mutagenic, antimutagenic activities, and phenolic compounds of *Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis*, *Industrial Crops and Products* **53** (2014) 60-64.
- [40] O. P. Sharma, T. K. Bhat, DPPH antioxidant assay revisited, *Food Chemistry* **113**(4) (2009) 1202-1205.
- [41] P. B. Miniyar, T. S. Chitre, H. J. Deuskar, S. S. Karve, K. S. Jain, Antioxidant activity of ethyl acetate extract of *Aquilaria agallocha* on nitrite-induced methaemoglobin formation,

- International Journal of Green Pharmacy* 2(2) (2008) 116-117.
- [42] S. Kilani, R. Ben Ammar, I. Bouhleb, A. Abdelwahed, N. Hayder, A. Mahmoud, K. Ghedira, L. Chekir-Ghedira, Investigation of extracts from (Tunisian) *Cyperus rotundus* as antimutagens and radical scavengers, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20(3) (2005) 478-484.
- [43] S. Kilani, M. Ben Sghaier, I. Limem, I. Bouhleb, J. Boubaker, W. Bhourri, I. Skandrani, A. Neffatti, R. Ben Ammar, M. G. Dijoux-Franca, K. Ghedira, L. Chekir-Ghedira, In vitro evaluation of antibacterial, antioxidant, cytotoxic and apoptotic activities of the tubers infusion and extracts of *Cyperus rotundus*, *Bioresource Technology* 99(18) (2008) 9004-9008.
- [44] P. S. C. Sri Harsha, M. I. Khan, P. Prabhakar, P. Giridhar, Cyanidin-3-glucoside, nutritionally important constituents and in vitro antioxidant activities of *Santalum album* L. berries, *Food Research International* 50(1) (2013) 275-281.
- [45] G. Candore, G. Colonna-Romano, C. R. Balistreri, D. D. Carlo, M. P. Grimaldi, F. Listi, D. Nuzzo, S. Vasto, D. Lio, C. Caruso, Biology of Longevity: Role of the Innate Immune System, *Rejuvenation Research* 9(1) (2006) 143-148.
- [46] T. Town, V. Nikolic, J. Tan, The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses, *Journal of Neuroinflammation* 2 (2005) 24-34.
- [47] K. S. Krabbe, M. Pedersen, H. Bruunsgaard, Inflammatory mediators in the elderly, *Experimental Gerontology* 39(5) (2004) 687-699.
- [48] H. Bruunsgaard, The clinical impact of systemic low-level inflammation in elderly populations. With special reference to cardiovascular disease, dementia and mortality, *Danish Medical Bulletin* 53(3) (2006) 285-309.
- [49] C. E. Finch, T. E. Morgan, Systemic inflammation, infection, ApoE alleles, and Alzheimer disease: a position paper, *Current Alzheimer Research* 4(2) (2007) 185-189.
- [50] J. M. Rubio-Perez, J. M. Morillas-Ruiz, A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines, *The Scientific World Journal* 2012 (2012) 1-15.
- [51] S. S. Kim, O. J. Oh, H.-Y. Min, E.-J. Park, Y. Kim, H. J. Park, Y. Nam Han, S. K. Lee, Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells, *Life Sciences* 73(3) (2003) 337-348.
- [52] H. Rahman, K. Vakati, M. C. Eswaraiyah, In-Vivo and In-Vitro Anti-Inflammatory Activity of *Aquilaria agallocha* Oil, *International Journal of Basic Medical Sciences and Pharmacy* 2(1) (2012) 7-10.
- [53] N. Banno, T. Akihisa, K. Yasukawa, H. Tokuda, K. Tabata, Y. Nakamura, R. Nishimura, Y. Kimura, T. Suzuki, Anti-inflammatory activities of the triterpene acids from the resin of *Boswellia carteri*, *Journal of Ethnopharmacology* 107(2) (2006) 249-253.
- [54] M. R. Chevrier, A. E. Ryan, D. Y. W. Lee, M. Zhongze, Z. Wu-Yan, C. S. Via, *Boswellia carterii* extract inhibits TH1 cytokines and promotes TH2 cytokines in vitro, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12(5) (2005) 575-580.
- [55] K. Tsoyi, H. J. Jang, Y. S. Lee, Y. M. Kim, H. J. Kim, H. G. Seo, J. H. Lee, J. H. Kwak, D.-U. Lee, K. C. Chang, (+)-Nootkatone and (+)-valencene from rhizomes of *Cyperus rotundus* increase survival rates in septic mice due to

- heme oxygenase-1 induction, *Journal of Ethnopharmacology* **137**(3) (2011) 1311-1317.
- [56] S.-H. Jung, S. J. Kim, B.-G. Jun, K.-T. Lee, S.-P. Hong, M. S. Oh, D. S. Jang, J.-H. Choi, α -Cyperone, isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus*, inhibits LPS-induced COX-2 expression and PGE2 production through the negative regulation of NF κ B signalling in RAW 264.7 cells, *Journal of Ethnopharmacology* **147**(1) (2013) 208-214.
- [57] Y. Matsuo, Y. Mimaki, α -Santalol derivatives from *Santalum album* and their cytotoxic activities, *Phytochemistry* **77** (2012) 304-311.
- [58] A. Mishra, S. S. Gauri, S. K. Mukhopadhyay, S. Chatterjee, S. S. Das, S. M. Mandal, S. Dey, Identification and structural characterization of a new pro-apoptotic cyclic octapeptide cyclosaplin from somatic seedlings of *Santalum album* L, *Peptides* **54** (2014) 148-158.
- [59] G. I. Lee, J. Y. Ha, K. R. Min, H. Nakagawa, S. Tsurufuji, I. M. Chang, Y. Kim, Inhibitory effects of Oriental herbal medicines on IL-8 induction in lipopolysaccharide-activated rat macrophages, *Planta Medica* **61**(1) (1995) 26-30.
- [60] A. B. Gokhale, A. S. Damre, K. R. Kulkarni, M. N. Saraf, Preliminary evaluation of anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *S. lappa*, *A. speciosa* and *A. aspera*, *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* **9**(5) (2002) 433-437.
- [61] M. Jin, H. J. Lee, J. H. Ryu, K. S. Chung, Inhibition of LPS-induced NO production and NF-kappaB activation by a sesquiterpene from *Saussurea lappa*, *Archives of Pharmacal Research* **23**(1) (2000) 54-58.
- [62] F. Zhao, H. Xu, E.-Q. He, Y.-T. Jiang, K. Liu, Inhibitory effects of sesquiterpenes from *Saussurea lappa* on the overproduction of nitric oxide and TNF-alpha release in LPS-activated macrophages, *Journal of Asian Natural Products Research* **10**(11-12) (2008) 1045-1053.
- [63] J. Y. Cho, K. U. Baik, J. H. Jung, M. H. Park, In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*, *European Journal of Pharmacology* **398**(3) (2000) 399-407.
- [64] H.-G. Choi, D.-S. Lee, B. Li, Y. H. Choi, S.-H. Lee, Y.-C. Kim, Santamarin, a sesquiterpene lactone isolated from *Saussurea lappa*, represses LPS-induced inflammatory responses via expression of heme oxygenase-1 in murine macrophage cells, *International Immunopharmacology* **13**(3) (2012) 271-279.
- [65] K.-S. Oh, T.-J. Park, B.-H. Choi, D.-K. Lee, T.-K. Lee, K.-T. Kim, Inhibition of nicotinic receptor-mediated catecholamine secretion by *dryobalanops aromatica* in bovine adrenal chromaffin cells, *Pharmacological Research* **42**(6) (2000) 559-564.
- [66] T.-J. Park, Y.-S. Park, T.-G. Lee, H. Ha, K.-T. Kim, Inhibition of acetylcholine-mediated effects by borneol, *Biochemical Pharmacology* **65**(1) (2003) 83-90.
- [67] M. H. Pourgholami, M. Kamalinejad, M. Javadi, S. Majzoob, M. Sayyah, Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in male mice, *Journal of Ethnopharmacology* **64**(2) (1999) 167-171.
- [68] J. Guo, J.-A. Duan, Y. Tang, Y. Li, Sedative and anticonvulsant activities of styrax after oral and intranasal administration in mice, *Pharmaceutical Biology* **49**(10) (2011) 1034-1038.

- [69] Y. C. Kim, E. H. Lee, Y. M. Lee, H. K. Kim, B. K. Song, E. J. Lee, H. M. Kim, Effect of the aqueous extract of *Aquilaria agallocha* stems on the immediate hypersensitivity reactions, *Journal of Ethnopharmacology* **58**(1) (1997) 31-38.
- [70] H. Takemoto, M. Ito, T. Shiraki, T. Yagura, G. Honda, Sedative effects of vapor inhalation of agarwood oil and spikenard extract and identification of their active components, *Journal of Natural Medicines* **62**(1) (2008) 41-46.
- [71] T. Alla, M. Handral, K. Nandakumar, N. Venkatrao, Shalam, Satyanaryana, S. M. Shantakumar, Anxiolytic and anticonvulsant activity of alcoholic extract of heartwood of *Aquilaria agallocha* roxb, (Thymelaeaceae) in mice, *Pharmacologyonline* **1** (2007) 564-572.
- [72] Z. Rabiei, M. Hojjati, M. Rafieian-Kopaeia, Z. Alibabaei, Effect of *Cyperus rotundus* tubers ethanolic extract on learning and memory in animal model of Alzheimer, *Biomedicine & Aging Pathology* **3**(4) (2013) 185-191.
- [73] K. Hemanth Kumar, A. Tamatam, A. Pal, F. Khanum, Neuroprotective effects of *Cyperus rotundus* on SIN-1 induced nitric oxide generation and protein nitration: Ameliorative effect against apoptosis mediated neuronal cell damage, *NeuroToxicology* **34**(Supplement C) (2013) 150-159.
- [74] A. G. Sunil, K. S. Kesavanarayanan, P. Kalaivani, S. Sathiya, V. Ranju, R. J. Priya, B. Pramila, F. D. S. Paul, J. Venkatesh, C. S. Babu, Total oligomeric flavonoids of *Cyperus rotundus* ameliorates neurological deficits, excitotoxicity and behavioral alterations induced by cerebral ischemic-reperfusion injury in rats, *Brain Research Bulletin* **84**(6) (2011) 394-405.
- [75] S. D. Ambavade, N. A. Mhetre, A. P. Muthal, S. L. Bodhankar, Pharmacological evaluation of anticonvulsant activity of root extract of *Saussurea lappa* in mice, *European Journal of Integrative Medicine* **1**(3) (2009) 131-137.

Cite this article as: S. Iskandar, M. S. Gnansounou, M. Robin, J. Lorquin, C. D. Giorgio, P. Piccerelle, Anti-inflammatory and Neuroprotective Activities of a Plant Extract Derived from Traditional Chinese Medicine: SuHeXiang Wan (AT000), *Chemistry of Advanced Materials* **3**(2) (2018) 36-59.

5 PARTIE 2. EXTRAIT AT00X

L'extrait AT000 contient une plante non répertoriée dans la pharmacopée française ; le *Dryobalanops aromatica*. Bien que cette plante soit exploitable en Chine, grâce à ses propriétés thérapeutiques, son utilisation en France dans les compléments alimentaires est considérée comme controversée (Pharmanager, 2016). Pour cela, une étude de l'alimentarité des 9 plantes nous a mené à substituer le *Dryobalanops aromatica* par du *Cinnamomum camphora*, composé majoritairement présent dans le *Dryobalanops aromatica* (Soepadmo et al., 1995), tout en gardant dans un premier temps la composition équi-massique de l'extrait. Cette deuxième composition désignée par AT00X constitue donc la première version alimentaire de l'extrait AT000. L'extrait AT00X a subi différents tests d'évaluation des activités biologiques in vitro : activité antioxydante (test DPPH, KRL, ABTS et ORAC), activité anti-inflammatoire et cytotoxicité (test du NO *release*) et l'activité neuroprotectrice in vitro (survie neuronale, réseau des neurites et production de ROS).

Les plantes médicinales constituant l'extrait AT00X (résine et poudre) sont fournis par « Acegem Biological Technology Wuhu - China ». Les parties utilisées de chaque plante sont regroupées dans le Tableau 3.

Tableau 3. Les parties utilisées de chaque plante constituant l'extrait AT00X.

Plante	Partie utilisée
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Bourgeons
<i>Santalum album</i>	Cœur de bois
<i>Aquilaria agallocha</i>	Cœur de bois
<i>Boswellia carteri</i>	Résine
<i>Cyperus rotundus</i>	Bourgeons
<i>Styrax benzoin</i>	Résine
<i>Saussurea lappa</i>	Racine
<i>Liquidambar orientalis</i>	Résine
<i>Cinnamomum camphora</i>	Feuille

5.1 Préparation de l'extrait AT00X en résine

Au sein du laboratoire de chimie radicalaire, nous avons préparé l'extrait AT00X selon le protocole suivant :

Un total de 4,5 g du mélange de *Liquidambar orientalis* (500 mg), *Saussurea lappa* (500 mg), *Aquilaria agallocha* (500 mg), *Santalum album* (500 mg), *Boswellia carteri* (500 mg), *Eugenia caryophyllata* (500 mg), *Cyperus rotundus* (500 mg), *Styrax benzoin* (500 mg) et *Cinnamomum camphora* (500 mg) ont été pulvérisés et extraits une fois avec 45 mL d'un mélange eau/éthanol (70:30, v/v) à 80-85 °C avec un condenseur à reflux pendant 3 heures. L'extrait a ensuite été filtré sous vide à l'aide d'une fiole Büchner et évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif à 60 °C. On obtient une résine marron (rendement ~ 10%) (Fig. 41).

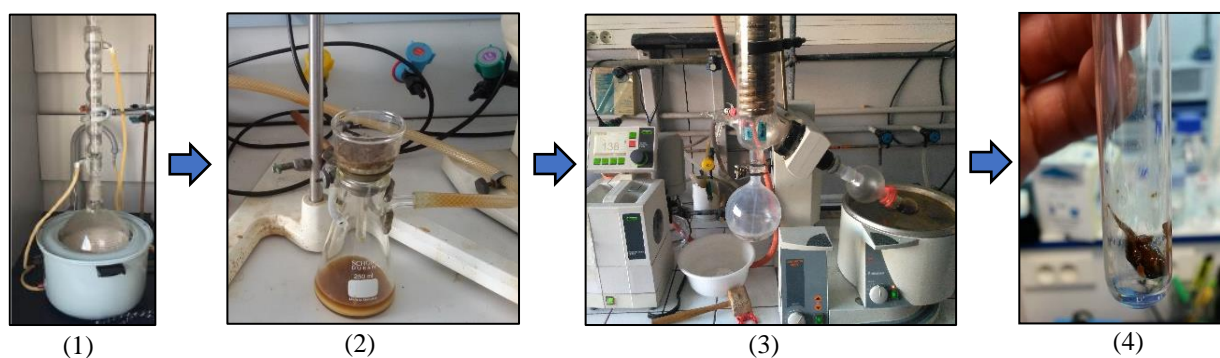


Fig. 41. Préparation de l'extrait au laboratoire. 1) Extraction, 2) Filtration, 3) Évaporation, 4) Extrait AT00X en résine.

La quantité d'extrait AT00X en résine produite au laboratoire est limitée, pour cela nous avons utilisé l'extrait AT00X en poudre provenant du fournisseur afin de réaliser l'étude d'évaluation des activités biologiques. L'extrait AT00X en poudre (5 kg) a été produit selon 4 étapes à l'échelle industrielle (Fig. 42).

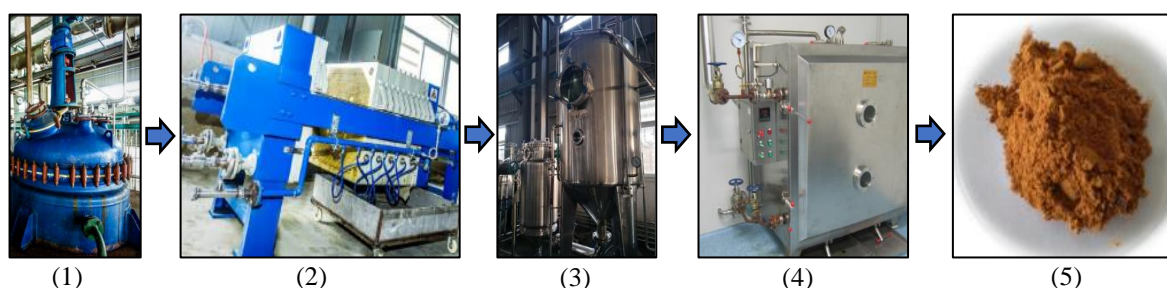


Fig. 42. Production industrielle de l'extrait. 1) Extraction, 2) Filtration, 3) Évaporation, 4) Séchage sous vide, 5) Extrait AT00X en poudre.

5.2 Évaluation des activités biologiques de l'extrait AT00X

Il existe de nombreux rapports sur les produits d'oxydation des protéines, des lipides et de l'ADN dans le tissu post mortem provenant de patients atteints de la MA, qui indiquent une augmentation du stress oxydatif (Butterfield and Boyd-Kimball, 2004; Smith et al., 1997). De plus, des études *in vitro* suggèrent que l'A β favorise le stress oxydatif et la peroxydation des lipides dans les synaptosomes et les cultures neuronales. Globalement, ces études suggèrent que le stress oxydatif joue un rôle central dans la pathogenèse de la MA (Jung et al., 2010; Mark et al., 1997; Yatin et al., 1999).

D'autre part, le vieillissement est caractérisé par une inflammation impliquée dans la pathogenèse de toutes les maladies liées à l'âge, telles que la MA (Candore et al., 2006), ainsi que par une expression accrue des médiateurs inflammatoires. Cette inflammation chronique est stimulée par des plaques A β et des enchevêtrements neurofibrillaires (Town et al., 2005). La caractéristique de l'état inflammatoire est l'augmentation des taux sériques de médiateurs inflammatoires tels que les cytokines (Bruunsgaard, 2006; Krabbe et al., 2004), les radicaux libres en tant qu'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'oxyde nitrique (Finch and Morgan, 2007; Rubio-Perez and Morillas-Ruiz, 2012).

L'implication de l'oxydation et de l'inflammation dans la maladie d'Alzheimer, nécessite la combinaison de plusieurs tests d'évaluation des propriétés : antioxydante (test DPPH, test KRL, test ABTS, test ORAC), anti-inflammatoire et cytotoxicité (test du NO *release*) et neuroprotectrice *in vitro* (survie neuronale, réseau des neurites et production de ROS).

5.2.1 Tests d'évaluation de l'activité antioxydante

5.2.1.1 Test DPPH

Le test DPPH est un test *in vitro* largement utilisé pour déterminer le potentiel antiradicalaire de l'échantillon testé. Il consiste à mesurer l'aptitude d'un composé antioxydant à réduire le radical DPPH \cdot (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle). Le DPPH \cdot est un radical stable ayant une couleur violette caractéristique. La réduction du radical DPPH par le composé antioxydant se manifeste par une diminution de l'absorbance et par sa décoloration du violet au jaune détectable par spectrophotométrie à 517 nm (Alam et al., 2013).

L'activité de piégeage des radicaux de l'extrait a été déterminée en mesurant son aptitude à piéger le radical libre stable DPPH, comme décrit par (Brand-Williams et al., 1995) avec

quelques modifications. En bref, une solution méthanolique de DPPH· à 0,05 mM a été préparée, et 193,3 µL de cette solution ont été ajoutés à 6,66 µL d'une solution de l'extrait dans du méthanol à différentes concentrations (de 0,2 à 10 mg/mL). Le mélange réactionnel a été incubé et agité à température ambiante pendant 30 minutes à l'obscurité et l'absorbance a été enregistrée à 517 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Vis Multiskan™ Multiplate Photometer. Le contrôle a été préparé en ajoutant 193,3 µL de la solution de DPPH (0,05 mM) à 6,63 µL de méthanol. Les valeurs de la CI₅₀, qui représente la concentration de l'extrait qui provoque la neutralisation de 50% des radicaux DPPH, ont été calculées à partir de la courbe de pourcentage d'inhibition (PI %) en fonction de la concentration. L'inhibition des radicaux libres par DPPH (%) a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$PI (\%) = [1 - (A_1/A_0)] \times 100$$

Où A₀ est l'absorbance de la réaction de contrôle et A₁ est l'absorbance en présence de l'échantillon. Le trolox, l'acide ascorbique et le gallate de propyle ont été utilisés comme témoins positifs. Les mesures ont été effectuées en triplicate. Les résultats du test DPPH sont présentés dans la (Fig. 43) et le Tableau 4.

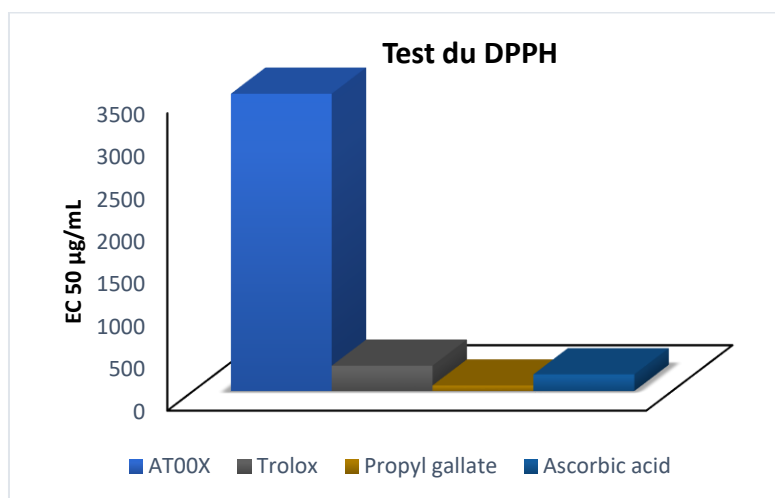


Fig. 43. Résultat du test DPPH de l'extrait AT00X.

Tableau 4. Valeur de la EC₅₀ du test DPPH.

Échantillons	DPPH EC ₅₀ (µg/mL)
AT00X	3498
Trolox	298
Ascorbic Acid	196,6
Propyl gallate	65,18

Le pouvoir antiradicalaire de l'extrait AT00X évalué par le test DPPH, est représenté par une valeur de la EC₅₀ de 3498 µg/mL. Selon les résultats enregistrés, l'extrait AT00X hydroalcoolique est doté d'un pouvoir antioxydant modéré, sa EC₅₀ de 3498 µg/mL est relativement faible que celles des standards Trolox, Acide ascorbique et Propyl gallate dont la valeur est de 298, 196,6 et 65,18 µg/mL respectivement.

5.2.1.2 Test ORAC

Le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) consiste à évaluer l'aptitude d'un échantillon à retarder l'oxydation de la fluorescéine par des radicaux libres peroxydes. Il est actuellement considéré comme le test chimique le plus pertinent pour mesurer l'activité antioxydante puisqu'il s'agit d'un test dynamique basé sur le stress induit par les radicaux peroxydes imitant les mécanismes cellulaires induits par ceux-ci (Prior et al., 2005; Seeram et al., 2008). Les radicaux peroxydes sont générés à partir de l'AAPH : dichlorhydrate de 2,2-azobis- (2-amidinopropane). Le taux de radicaux libres produits est proportionnel à la concentration en AAPH utilisée (Roginsky and Lissi, 2005). La diminution de la fluorescence de la fluorescéine est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre en fonction du temps en présence de l'échantillon à tester. Les résultats sont exprimés en équivalent de l'antioxydant de référence sélectionné, le Trolox.

Le test ORAC a été évalué comme décrit par (Ou et al., 2001) avec quelques modifications. L'extrait de plante, l'AAPH et la fluorescéine ont été dilués dans du tampon phosphate de potassium 100 mM (pH 7,4). 25 µL de chaque extrait (0,94 à 7,5 µg/mL) ou un tampon phosphate (blanc) ont été mélangés à 150 µL de solution de fluorescéine ($8,21 \times 10^{-5}$ mM) et incubés pendant 15 min à 37 °C. Un volume de 25 µL de solution AAPH (concentration finale de 153 mM) a été ajouté et la fluorescence a été immédiatement contrôlée à l'aide d'un fluorimètre à plaques Infinite M200 TECAN à des intervalles de 2 minutes pendant 90 minutes. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission utilisées sont respectivement de 485 nm et 530 nm. Une courbe d'étalonnage a été réalisée avec le trolox comme standard (0,4 à 12,5 µM). Les valeurs de l'ORAC ont été exprimées en µmol d'équivalent Trolox pour 100 g d'extrait (µmol TE/100g).

Tableau 5. Résultat du test ORAC de l'extrait AT00X comparé à des aliments de référence.

Échantillon	Équivalent Trolox (µmol/100 g)
AT00X	224010
Origan séché	175295
Romarin séché	165280
Thym séché	157380
Cannelle moulue	131420
Curcuma moulu	127068
Poivre séché	118400

Le Tableau 5 présente le pouvoir antioxydant de l'extrait AT00X par rapport aux aliments connus pour avoir une activité antioxydante importante (*USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods*). L'extrait AT00X présente une puissante activité antioxydante d'une valeur de 224010 équivalents de Trolox par rapport aux composés de référence.

5.2.1.3 Test KRL

Le test KRL (Kit Radicaux Libres), permet l'évaluation de la résistance globale du sang soumis à une attaque radicalaire. Les défenses antioxydantes intra- et extra-cellulaires contribuent au maintien de l'intégrité membranaire et des fonctions cellulaires jusqu'à la lyse des cellules sanguines. Ce test biologique breveté par le laboratoire Spiral Couternon - France, permet donc une mesure dynamique du potentiel global de défense antiradicalaire d'un individu. Concrètement, un extrait aqueux ou alcoolique du produit à tester est ajouté à une suspension standardisée d'hématies (ou un sang EDTA) qui sera ensuite mise en incubation pendant plusieurs heures à 37 °C en présence d'un générateur de radicaux libres. Les résultats intermédiaires sont exprimés en temps de demi-hémolyse. A l'aide de ce test, nous pouvons également déterminer in vitro, dans des conditions biologiques, la capacité "antioxydante" ou l'action "prooxydante" de différents composés. Ainsi, en ajoutant au milieu un composé à action antiradicalaire nous augmentons le potentiel global de défense contre l'agression radicalaire d'un sang témoin. Au contraire en ajoutant un composé à action proradicalaire nous diminuons la capacité antiradicalaire globale du sang témoin. La résistance globale du sang témoin à l'attaque radicalaire en présence ou non du produit est exprimée par le temps au bout duquel 50% des cellules sanguines sont lysées ($T_{1/2}$ en minutes).

Tableau 6. Pourcentage de variation du $T_{1/2}$ hémolyse du sang témoin.

Concentrations (mg/L) *	% de variation du $T_{1/2}$ hémolyse du sang témoin
	Extrait AT00X
0	0
1	4,83
2	7,55
5	16,28
10	28,91
20	54,21
50	116,72
100	201,52

* : Concentration en mg d'extrait par litre de milieu réactionnel

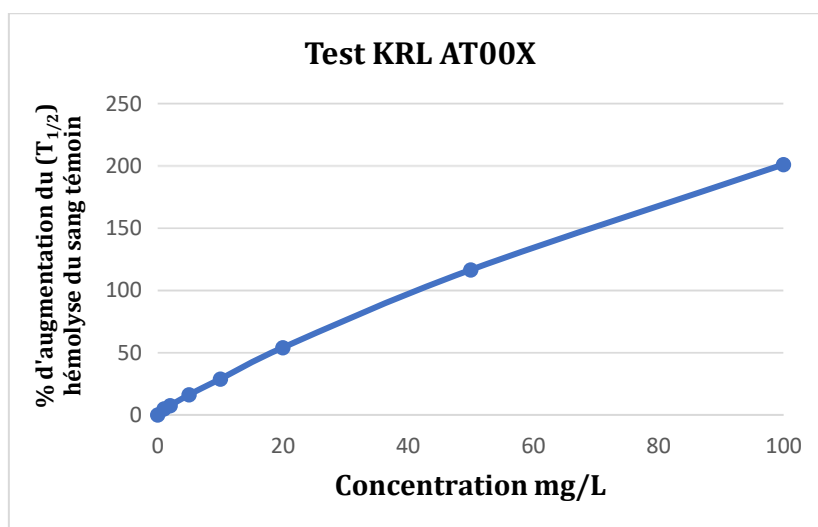


Fig. 44. Résultat du test KRL de l'extrait AT00X.

L'efficacité antiradicalaire de l'extrait est alors exprimée en pourcentage du potentiel global de défense antiradicalaire du sang témoin (%T_{1/2} du sang témoin) (Tableau 6). Les résultats sont standardisés en équivalents Trolox (analogue hydrosoluble de la vitamine E) et en équivalents Acide gallique (acide phénolique) (Fig. 45).

Le test a été réalisé sur l'extrait dans une gamme de concentration de 0 à 100 mg par litre de milieu réactionnel pour l'extrait.

Tableau 7. Equivalents mg de Trolox et mg d'acide gallique/g d'extrait.

Concentrations (mg/L) *	Pouvoir antiradicalaire d'AT00X	
	Equivalents mg de Trolox et mg d'acide gallique/g d'extrait	
	Trolox	Acide gallique
0	0	0
1	1887,35	877,29
2	1474,13	685,22
5	1272,08	591,30
10	1129,12	524,84
20	1058,67	492,10
50	911,87	423,86
100	787,15	365,89

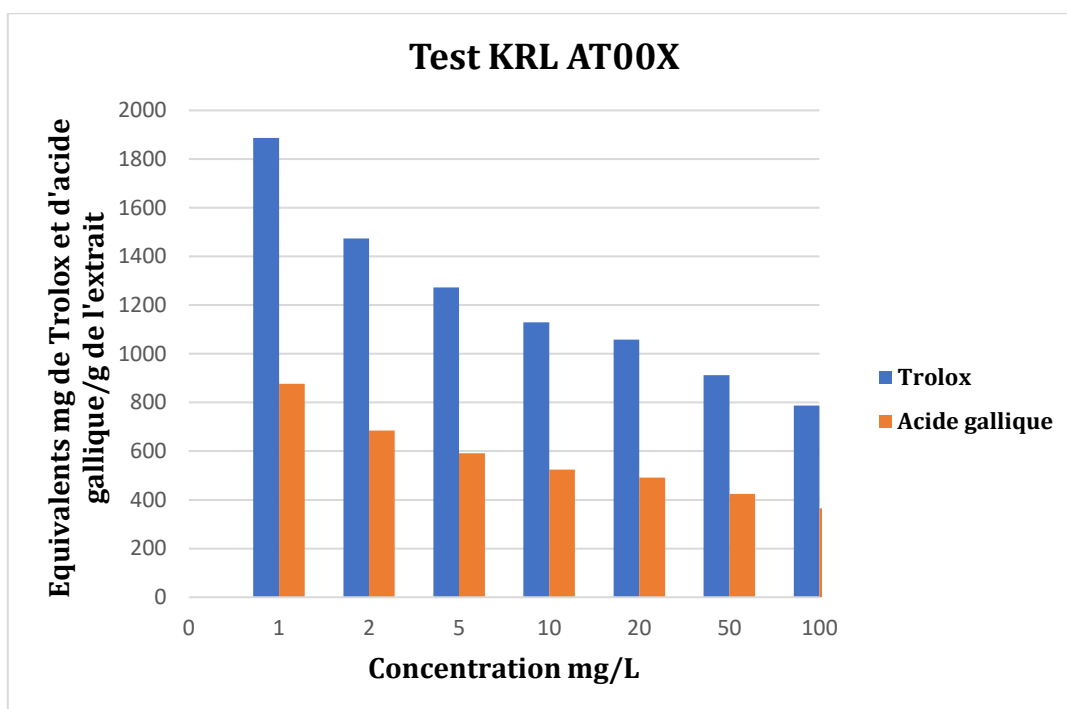


Fig. 45. Equivalents mg de Trolox et mg d'Acide gallique/g d'extrait.

Les résultats indiquent que l'extrait AT00X présente une capacité antiradicalaire dépendante de la dose et que ce pouvoir antioxydant est fortement croissant dans une gamme de concentrations de 0 à 20 mg/L de milieu réactionnel. Ainsi à une concentration de 20 mg/L, l'extrait AT00X augmente la résistance du sang témoin à une attaque radicalaire jusqu'à 54,21%. Dans ces conditions in vitro, un gramme d'extrait AT00X présente une capacité antioxydante respectivement équivalente à 1058,67 mg de Trolox® ou à 492,10 mg d'Acide gallique (Tableau 7).

5.2.1.4 Test ABTS

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+}. L'acide 2,2-azino-bis (3-éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique) (ABTS), réagit avec le persulfate de potassium (K₂S₂O₈), permettant la formation du radical ABTS^{•+} de coloration bleu-vert. Le cation radicalaire ABTS^{•+} réagit avec les antioxydants et se reconverti en sa forme neutre incolore par piégeage d'un proton. L'activité antioxydante de l'extrait AT00X a été mesurée selon le test ABTS en utilisant la méthode décrite par (Re et al., 1999) avec quelques modifications. La solution de travail du radical ABTS^{•+} a été préparée en faisant réagir l'ABTS (9,5 mL, 7 mM) avec du persulfate de potassium (245 µL, 100 mM) et en élevant le volume à 10 mL avec de l'eau distillée. La solution a été maintenue dans l'obscurité à

température ambiante pendant 18 h, puis diluée avec du tampon phosphate de potassium (0,1 M, pH 7,4) jusqu'à une absorbance de 1 ($\pm 0,02$) à 734 nm. Des échantillons d'AT00X à différentes concentrations (de 0,025 à 10 mg/mL) ont été préparés dans du méthanol. Le témoin a été préparé en ajoutant 2,9 mL de la solution d'ABTS^{•+} à 0,1 mL de méthanol. L'absorbance du mélange clair résultant a été enregistrée à 734 nm. Les valeurs de CI₅₀, qui représentent la concentration de l'extrait qui provoque la stabilisation de 50% des radicaux ABTS^{•+}, ont été calculées à partir du pourcentage de stabilisation en fonction de la courbe de concentration (Fig. 46). La stabilisation de l'ABTS^{•+} par AT00X a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$P.S (\%) = [1 - (A_1 / A_0)] \times 100$$

Où A₀ est l'absorbance de la réaction de contrôle et A₁ est l'absorbance en présence de l'échantillon. Le Trolox a été utilisé comme témoin positif (Tableau 8).

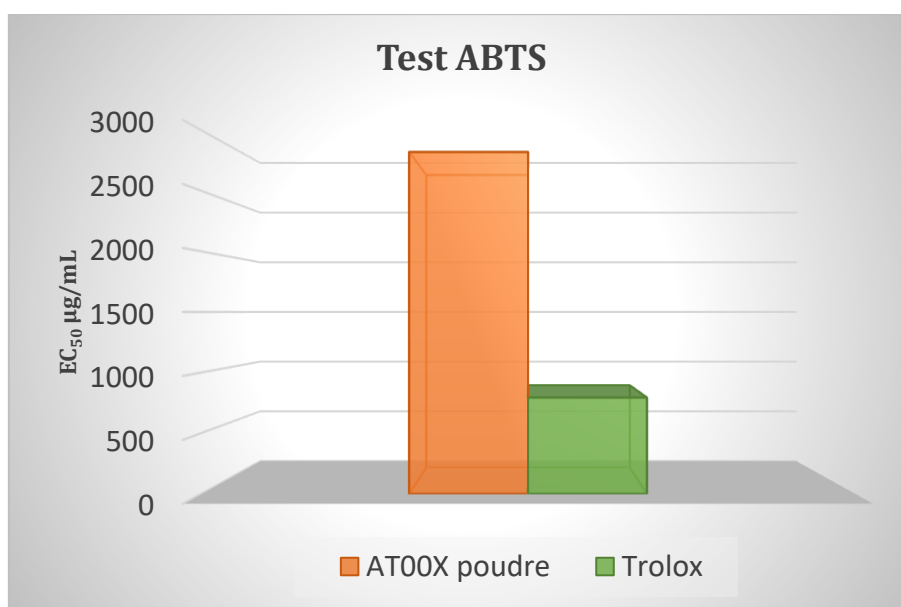


Fig. 46. Résultat du test ABTS de l'extrait AT00X.

Tableau 8. Valeur de la EC₅₀ du test ABTS de l'extrait AT00X.

Échantillons	ABTS EC ₅₀ (µg/mL)
AT00X	2819,2
Trolox	793,5

La figure 46 représente le résultat du test ABTS appliqué à l'extrait AT00X. la valeur mesuré 2819,2 µg/mL est modérée par rapport au Trolox.

L'activité antioxydante de l'extrait AT00X est due à la richesse des plantes en composés phénoliques ayant la capacité de piéger les radicaux libres. L'eugénol, le composant principal isolé d'*Eugenia caryophyllata*, possède de puissantes propriétés antioxydantes (Chaieb et al., 2007; Gülçin et al., 2004). L'extrait éthanolique de feuilles de *Liquidambar orientalis* a également montré une activité antioxydante élevée (Saraç and Şen, 2014). Il a été rapporté que l'extrait à l'acétate d'éthyle d'*Aquilaria agallocha* possède une activité d'élimination des radicaux libres (Sharma and Bhat, 2009) et des propriétés antioxydantes in vitro à différentes concentrations par inhibition de l'oxydation de l'hémoglobine induite par les nitrites dans l'hémolysat de sang humain (Miniyar et al., 2008). Les coumarines, les tanins et les flavonoïdes isolés à partir d'extrait de tubercules de *Cyperus rotundus* présentent des propriétés antioxydantes et apoptotiques (Kilani et al., 2005b, 2008b). Le cyanidine-3-glucoside, le principal pigment identifié dans l'extrait de baies de *Santalum album*, possède un potentiel antioxydant et une activité de piégeage élevée (Sri Harsha et al., 2013). Cette combinaison de molécules agit en synergie pour augmenter l'activité antioxydante globale de l'extrait AT00X.

5.2.2 Test d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire

Les inflammations de bas grade ont été largement impliquées dans les processus dégénératifs de la peau humaine tels que le photovieillissement et l'atopie. La réduction des réactions inflammatoires de bas grade par des produits topiques peut s'avérer nécessaire en cas d'agression cutanée afin d'obtenir une cicatrisation optimale de la plaie et de rétablir l'équilibre physiologique de la peau humaine. Afin d'identifier de nouveaux candidats anti-inflammatoires, un test anti-inflammatoire in vitro a été développé avec une lignée de cellules murines : le test de macrophages RAW 264.7. Ce test a été utilisé pour évaluer les effets inhibiteurs de composés chimiques ou d'extraits naturels sur la cascade inflammatoire de bas grade, entraînant une surproduction de NO dans la muqueuse endothéliale des vaisseaux sanguins. Dans la présente étude, nous avons évalué la capacité de l'extrait à inhiber la cascade pro-inflammatoire menant à la production de NO dans les macrophages de souris.

5.2.2.1 Culture cellulaire

Des cellules de macrophages de souris (RAW 264.7) ont été maintenues dans du DMEM avec de la L-glutamine stable additionnée de pénicilline 100 UI/mL, 100 µg/mL de streptomycine et 10% de sérum de veau inactivé, fraîchement préparées, stockées au plus 3 semaines.

Le test anti-inflammatoire in vitro a été déterminé en mesurant la capacité des macrophages à générer une forte réponse inflammatoire lorsqu'ils sont stimulés par des antigènes, induisant une libération de NO (Garayev et al., 2017). Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de culture tissulaire à 48 puits à une concentration de 1.10^5 cellules/mL (200 µL/puits) pendant 24 heures à 37 °C (5% de CO₂). Ensuite, le milieu de culture a été remplacé par 200 µL de milieu contenant les concentrations appropriées d'extrait AT00X et les cellules ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂/90% d'air pendant une heure. À la fin de la période d'incubation, du LPS pro-inflammatoire provenant de *E. coli* a été ajouté à des cultures cellulaires (1 µg/mL), puis les cellules ont été incubées dans les mêmes conditions pendant 24 heures. La libération de NO (NO *release*) a été évaluée indirectement en mesurant l'accumulation de nitrite/nitrate, les produits finis stables de l'oxydation du NO, dans le surnageant de culture par la réaction de Griess. 100 µL du surnageant ont été transférés dans les puits d'une plaque de culture tissulaire à 96 puits, et 100 µL du réactif modifié de Griess ont été ajoutés à chaque puits. Après 15 minutes à température ambiante, la densité optique (DO) de chaque puits a été lue à 540 nm par un lecteur de fluorescence-luminescence Infinite M200 Pro (TECAN). Les résultats obtenus pour les puits traités avec l'extrait AT00X ont été comparés à ceux des puits témoins non traités (DMSO, viabilité à 100%) et convertis en pourcentages.

Parallèlement à l'évaluation de la libération de NO, la viabilité cellulaire a été mesurée pour valider le test. Le réactif de colorant vital WST-1 a été utilisé pour mesurer la respiration des cellules mitochondriales. À cette fin, le milieu de culture a été décanté et 100 µL de réactif WST-1 (dilution au 1/10) ont été ajoutés dans chaque puits. Après une période d'incubation de 30 minutes à 37 °C (5% de CO₂), la densité optique de chaque puits a été lue à 450 nm par un lecteur de fluorescence-luminescence Infinite M200 Pro (TECAN). Les résultats obtenus pour les puits traités avec l'extrait AT00X ont été comparés à ceux des puits témoins non traités (DMSO, viabilité à 100%) et convertis en pourcentages. Les expériences ont été effectuées en double et la dexaméthasone a été utilisée comme contrôle positif aux concentrations de 1, 5, 10, 50 et 100 µM.

L'inhibition de la libération de NO et l'inhibition de la viabilité cellulaire ont été exprimées en pourcentages par rapport aux témoins négatifs :

$$P.I (\%) = 100 \times (DO_{\text{mesure}} - DO_{\text{témoin}}) / DO_{\text{contrôle}} - DO_{\text{témoin}}$$

Les concentrations de l'extrait entraînant respectivement une diminution de 50% de la libération de NO (IC₅₀-libération de NO) et de 50% de la viabilité cellulaire (IC₅₀-viabilité cellulaire) ont été calculées par analyse de régression non linéaire à l'aide du logiciel TableCurve Version 2.0. Le rapport anti-inflammatoire correspond au rapport entre l'activité anti-inflammatoire et la toxicité (Fig. 47). Il a été exprimé comme suit :

$$\text{Rapport anti-inflammatoire} = IC_{50\text{-viabilité cellulaire}} / IC_{50\text{-libération de NO}}$$

Tableau 9. Activité anti-inflammatoire de l'extrait AT00X.

	Libération de NO IC ₅₀ (µM ou µg/mL)	Toxicité IC ₅₀ (µM ou µg/mL)	Ratio anti- inflammatoire
AT00X	0.81	80.30	99.13
Dexaméthasone	4.31 ± 1.45 µM	163.22 ± 74.96 µM	37.87

L'activité anti-inflammatoire et la cytotoxicité de l'extrait AT00X ont été testées in vitro et comparées à la dexaméthasone en tant que contrôle positif. Les résultats sont résumés dans le (Tableau 9). L'extrait AT00X montre une libération de NO avec une valeur de IC₅₀ < 20 µM sur les macrophages RAW 264.7 et une cytotoxicité avec une valeur de IC₅₀ > 50 µM.

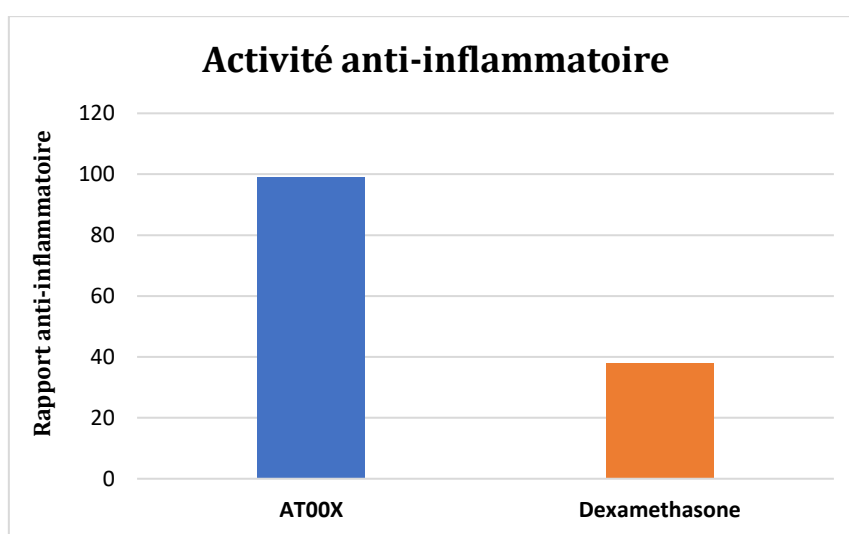


Fig. 47. Activité anti-inflammatoire de l'extrait AT00X.

L'extrait AT00X a montré une activité anti-inflammatoire efficace par rapport à la dexaméthasone, en inhibant la libération de NO à partir de macrophages murins de souris stimulés par le LPS et en réduisant la cytotoxicité induite par le LPS (Fig. 47). Les plantes constituant l'extrait AT00X sont riches en molécules ayant des propriétés anti-inflammatoires. L'eugénol a montré une activité anti-inflammatoire en supprimant l'expression de la cyclooxygénase-2 dans des cellules de macrophages de souris stimulées par le lipopolysaccharide (LPS) (Kim et al., 2003). L'huile d'*Aquilaria agallocha* a démontré une activité anti-inflammatoire, réduisant ainsi considérablement l'œdème induit par le carraghénane (Rahman et al., 2012). Les acides triterpéniques isolés à partir de la résine de *Boswellia carteri* ont démontré une activité anti-inflammatoire puissante dans le dosage de l'œdème de l'oreille de la souris (Banno et al., 2006). La délivrance d'extrait de résine de *Boswellia* a entraîné une inhibition dose-dépendante des cytokines TH1 couplée à une potentialisation dose-dépendante des cytokines TH2 indiquant qu'un mélange purifié d'acides boswelliques de résine végétale de *Boswellia carteri* présente des propriétés immunomodulatrices dépendantes du porteur in vitro (Chevrier et al., 2005). L'extrait de rhizomes de *Cyperus rotundus* augmentait l'expression de HO-1 en fonction de la concentration, ce qui est corrélé à une inhibition significative de la production de iNOS/NO dans des cellules RAW 264.7 activées par le LPS (Tsoyi et al., 2011). L' α -Cyperone, le principal composé isolé des rhizomes de *Cyperus rotundus*, inhibe l'expression de la COX-2 induite par le LPS et la production de prostaglandine E₂ (PGE₂) par la régulation négative de la signalisation du NF κ B dans les cellules RAW 264.7 (Jung et al., 2013). Le (9R, 10E) -9-hydroxy- α -santalal, un sesquiterpène isolé du *Santalum album*, présente une cytotoxicité sélective de la tumeur vis-à-vis des cellules HL-60 (Matsuo and Mimaki, 2012). La cyclosapline, un nouvel octapeptide cyclique purifié à partir de plantules somatiques du *Santalum album*, a montré une activité cytotoxique contre la lignée cellulaire du cancer du sein humain (MDA-MB-231) en culture, en induisant la mort cellulaire apoptotique par activation de la caspase 3 (Mishra et al., 2014). La *Saussurea lappa* a montré des effets inhibiteurs sur l'induction de l'IL-8 dans les macrophages de rat activés par des lipopolysaccharides (Lee et al., 1995). L'extrait éthanolique du *Saussurea lappa* affecte l'inflammation aiguë et chronique induite chez les souris et les rats en inhibant l'œdème induit par le carraghénane et en empêchant l'accumulation de cellules inflammatoires dans la péritonite induite par le carraghénane (Gokhale et al., 2002). La «Dehydrocostus lactone», une lactone sesquiterpénique de *Saussurea lappa* supprime la production d'oxyde nitrique induite par le LPS (Jin et al., 2000) et inhibe la libération de TNF- α (Zhao et al., 2008). La

«cynaropicrine», lactone sesquiterpénique du *Saussurea lappa* inhibe la lignée cellulaire de macrophages murins du TNF- α et inhibe de manière dose-dépendante la prolifération des lymphocytes stimulés par la Concanavaline A (Con-A) (Cho et al., 2000). La Santamarin, une lactone sesquiterpénique isolée du *Saussurea lappa*, réprime les réponses inflammatoires induites par le LPS via l'expression de l'hème oxygénase-1 dans des cellules macrophages murines (Choi et al., 2012). Toutes ces propriétés s'additionnent pour démontrer l'activité anti-inflammatoire de l'extrait AT00X.

5.2.3 *Évaluation de l'activité neuroprotectrice de l'extrait AT00X*

La maladie d'Alzheimer (AD) touche principalement les personnes de plus de 65 ans souffrant de différents symptômes cliniques tels que le déclin progressif de la mémoire, de la pensée, du langage et de la capacité d'apprentissage. Le rôle toxique du peptide β -amyloïde ($A\beta$) est maintenant passé des fibrilles $A\beta$ insolubles à des plus petits agrégats d'oligomères $A\beta$ solubles ($A\beta O$).

Les peptides $A\beta$ sont produits sous forme de monomères solubles et subissent une oligomérisation et une formation de fibrilles amyloïdes via un processus de polymérisation dépendant de la nucléation. Au cours de la formation de fibrilles $A\beta$ in vitro, divers agrégats intermédiaires non fibrillaires sont formés; collectivement appelés «oligomères solubles et protofibrilles», ils se sont avérés précéder l'apparition des fibrilles (Jan et al., 2010). Des preuves croissantes provenant de diverses sources indiquent que les prototypes de $A\beta O$ /protofibrilles sont considérés comme des espèces toxiques dans la pathogenèse de la MA (Sakono and Zako, 2010). En utilisant la concentration et le temps d'exposition à l' $A\beta O$, il est possible de reproduire leur effet précoce (stress oxydant) et leur développement d'altération structurelle à long terme (mort des neurones).

Toute substance réduisant la neurotoxicité de l' $A\beta$ peut être utile en tant que nouvel agent thérapeutique pour le traitement ou la prévention de la MA.

L'acétylcholinestérase est impliquée dans la terminaison de la transmission impulsionnelle par hydrolyse rapide du neurotransmetteur acétylcholine dans de nombreuses voies cholinergiques des systèmes nerveux central et périphérique. La MA est associée à une perte de neurones cholinergiques dans le cerveau et à une diminution du taux d'acétylcholine. La principale cible thérapeutique dans les stratégies de traitement de la maladie d'Alzheimer est l'inhibition de l'AcChE du cerveau. Il n'existe pas de traitement curatif contre la MA et les

inhibiteurs réversibles de l'AChE, utilisés en thérapie, traitent les symptômes liés à la mémoire, à la pensée, au langage, au jugement et à d'autres processus de la pensée. Par conséquent, ils stimulent la neurotransmission cholinergique dans les régions du cerveau antérieur et compensent la perte de cellules cérébrales en fonctionnement (Spilovska et al., 2013).

AROMA THERAPEUTICS développe un extrait de plante qui pourrait protéger contre la neurotoxicité de l'A β . Le but de cette étude est d'évaluer les effets de l'extrait AT00X (à 7 concentrations) dans les neurones corticaux primaires de rat intoxiqués avec A β à (20 μ M pendant 24h), un modèle in vitro de la MA bien validé (Callizot et al., 2013). La survie neuronale ainsi que la protection du réseau de neurites ont été étudiées. De plus, l'effet du composé sur la génération de ROS a été évalué. Parallèlement, l'effet de l'extrait AT00X sur l'acétylcholine estérase (AChE) a été mesuré. Dans cet essai, le BDNF a été utilisé comme molécule de référence.

5.2.3.1 Culture primaire de neurones corticaux

Les neurones corticaux de rat sont cultivés comme décrit par (Callizot et al., 2013). En bref, les fœtus sont prélevés et immédiatement placés dans un milieu Leibovitz L-15 glacé contenant une solution à 2% de pénicilline (10 000 U/mL) et de streptomycine (10 mg/mL) et 1% d'albumine de sérum bovin (BSA). Le cortex sera traité pendant 20 min à 37 °C avec une solution de trypsine-EDTA à une concentration finale de 0,05% de trypsine et de 0,02% d'EDTA. La dissociation sera arrêtée par addition de DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) avec 4,5 g/litre de glucose, contenant de la DNase I degré II (concentration finale 0,5 mg/mL) et 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Les cellules sont dissociées mécaniquement par trois passages forcés à travers le bout d'une pipette de 10 mL. Les cellules sont ensuite centrifugées à 515 x g pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant est jeté et le culot sera remis en suspension dans un milieu de culture défini consistant en un milieu Neurobasal avec une solution à 2% de supplément B27, 2 mmol/litre de L-glutamine, une solution à 2% de pénicilline et 10 ng/mL de BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor). Les cellules viables sont comptées dans un cytomètre Neubauer, en utilisant le test d'exclusion au bleu trypan. Les cellules sontensemencées à une densité de 20 000 par puits dans des plaques à 96 puits préalablement revêtues de poly-L-lysine et sont cultivées à 37 °C dans un incubateur à air (95%)/CO₂ (5%). Le support est changé tous les 2 jours. Les neurones corticaux sont intoxiqués par les solutions de A β après 11 jours de culture.

5.2.3.2 Composé d'essai et exposition humaine à l'A β ₁₋₄₂

La préparation de A β ₁₋₄₂ est effectuée en suivant la procédure décrite par (Callizot et al., 2013). En bref, le peptide A β ₁₋₄₂ est dissous dans le milieu de culture défini susmentionné, dépourvu de sérum, à une concentration initiale de 40 μ mol/L. Cette solution est agitée doucement pendant 3 jours à 37 °C dans le noir et immédiatement utilisée après avoir été correctement diluée dans le milieu de culture aux concentrations utilisées (20 μ M, correspondant à 2 μ M d'oligomères A β).

L'extrait AT00X est dissous dans du DMSO pur et dilué avec du milieu de culture pour obtenir la concentration finale requise dans le puits de culture.

La concentration finale de DMSO est de 0,3%.

AT00X et BDNF (50 ng/mL) sont dissous dans le milieu de culture et ensuite pré-incubés avec les neurones corticaux primaires pendant 1 heure avant l'application de A β ₁₋₄₂. La préparation d'A β ₁₋₄₂ est ajoutée à une concentration finale de 20 μ M (2 μ M d'A β O) diluée dans du milieu témoin en présence de l'extrait de plante AT00X ou de BDNF (utilisé comme standard).

5.2.3.3 Organisation de plaques de culture

L'extrait de plante AT00X est testé sur une culture dans une plaque à 96 puits (6 puits par condition). L'extrait AT00X est pré-incubé pendant 1 heure avant l'application de l'A β . Les conditions évaluées sont présentées dans le Tableau 10.

Tableau 10. Différentes concentrations de l'extrait AT00X testées in vitro.

Plaque 1 (MAP-2 / ROS)
Contrôle (véhicule)
+ A β (20 μ M 24H) / véhicule
+ A β (20 μ M 24H) / AT00X 500 ng/mL
+ A β (20 μ M 24H) / AT00X 1 μ g/mL
+ A β (20 μ M 24H) / AT00X 5 μ g/mL
+ A β (20 μ M 24H) / AT00X 10 μ g/mL
+ A β (20 μ M 24H) / AT00X 30 μ g/mL
+ A β (20 μ M 24H) / AT00X 60 μ g/mL
+ A β (20 μ M 24H) / AT00X 90 μ g/mL
+ A β (20 μ M 24H) / BDNF (50 ng/mL)

5.2.3.4 Coloration sur cellules vivantes pour évaluation des ROS

24 heures après l'intoxication, les cellules vivantes sont incubées avec le réactif cellROX vert pendant 30 min à 37 °C, puis fixées avec une solution froide d'éthanol (95%) et d'acide acétique (5%) pendant 5 min à -20 °C.

5.2.3.5 Coloration des neurones et des neurites

Après perméabilisation avec 0,1% de saponine, les cellules sont incubées pendant 2 heures avec un anticorps monoclonal anti-protéine 2 associée à des microtubules (MAP-2) à une dilution de 1/400 dans du PBS contenant 1% de sérum de veau foetal et 0,1% de saponine. (Cet anticorps colore spécifiquement les corps cellulaires et les neurites, permettant ainsi l'étude de la survie cellulaire neuronale et du réseau de neurites).

Cet anticorps est révélé avec l'anticorps secondaire de chèvre IgG Alexa Fluor 568 à la dilution au 1/400 dans du PBS contenant 1% de SVF, 0,1% de saponine, pendant 1 heure à la température ambiante. Les noyaux des neurones ont été marqués par un marqueur fluorescent (solution de Hoechst).

Pour chaque condition, 30 images (représentant la zone de tous les puits) par puits sont automatiquement prises en utilisant ImageXpress (Molecular Devices) avec un grossissement de 20x. Toutes les images sont prises dans les mêmes conditions.

Les paramètres suivants sont évalués à l'aide de « Custom Module Editor » (Molecular Devices) :

- Analyse de la survie des neurones (coloration MAP-2),
- Analyse du réseau de neurites (coloration MAP-2)
- Analyse des ROS (coloration au réactif cellROX green)

5.2.3.6 Activité de l'acétylcholinestérase (AChE)

L'activité de l'AChE est mesurée à l'aide du kit d'essai AChE. L'extrait AT00X est dissous dans le milieu de culture à 1 mg/mL. 50 µL d'AT00X à 1 mg/mL et 50 µL du mélange réactionnel sont mélangés et incubés à température ambiante entre 10 et 30 min. La densité optique (DO) est évaluée par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 410 nm par un appareil Glomax (Promega).

5.2.3.7 Analyses statistiques

Les données sont exprimées en pourcentage des conditions de contrôle (pas d'intoxication $A\beta$, pas de composé = 100%). Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. L'analyse statistique et les graphiques sont réalisés par one-way ANOVA, suivie du test de Dunnett, si autorisé, à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5.0, $p < 0,05$ est considéré comme significatif.

5.2.3.8 Résultats du test in vitro

- Effet de l'extrait AT00X sur la survie des neurones corticaux chez le rat et sur le réseau de neurites en présence du peptide $A\beta_{1-42}$ après 24 heures d'application

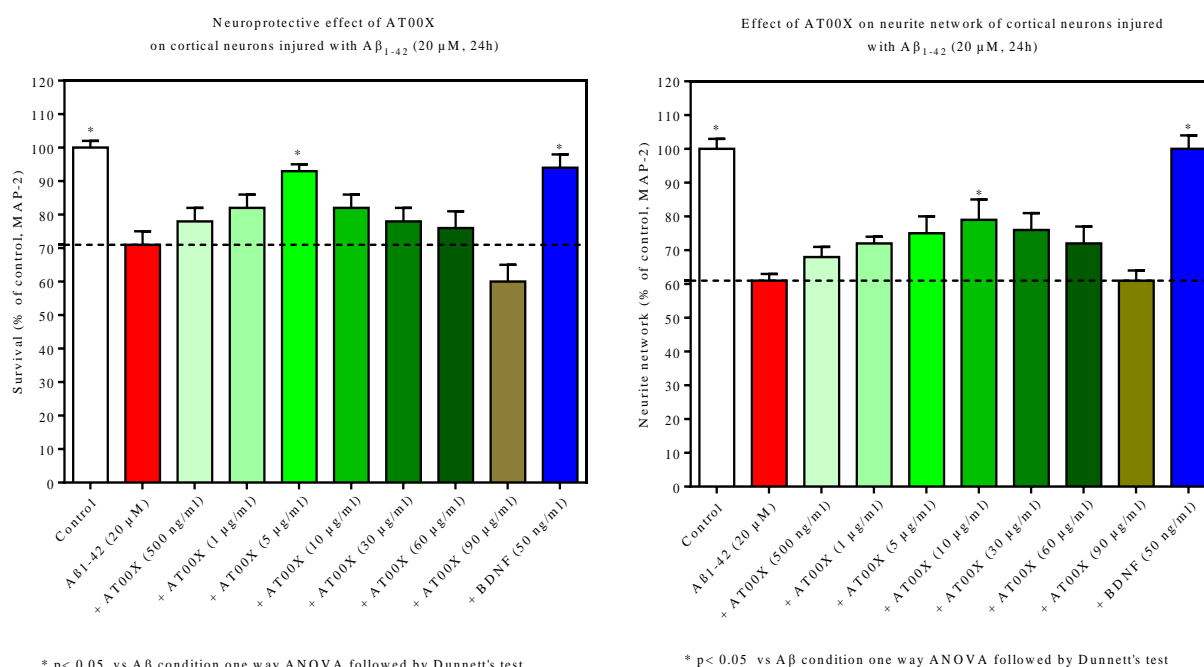


Fig. 48. Effet d'AT00X sur la survie des neurones et le réseau de neurites des neurones corticaux primaires de rat intoxiqués par le peptide $A\beta_{1-42}$ (24h, 20 μ M correspondant à 2 μ M de $A\beta$). Les données exprimées en pourcentage de contrôle montrent la moyenne \pm SEM (100% = pas de $A\beta$, pas de composé). ANOVA à un facteur suivie du test de Dunnett, $n = 4-6$. * $p < 0,05$ était considéré comme significatif.

Le peptide neurotoxique $A\beta_{1-42}$ induit une mort neuronale importante (de 30%) et une perte du réseau de neurites (~ 40%). L'extrait AT00X ajouté 1h avant l'application du peptide, a montré un effet significatif sur la survie des neurones à 5 μ g/mL (93% des neurones étaient protégés contre les dommages amyloïdes). De plus, un effet protecteur a été observé sur le réseau de neurites. À 10 μ g/mL, la neuroprotection du réseau était significative (Fig. 48). Le

BDNF utilisé comme standard a montré un effet protecteur significatif et important (survie des neurones et réseau de neurites).

- Effet de l'extrait AT00X sur la production de ROS dans les neurones corticaux de rat en présence du peptide $A\beta_{1-42}$ après 24 heures d'application

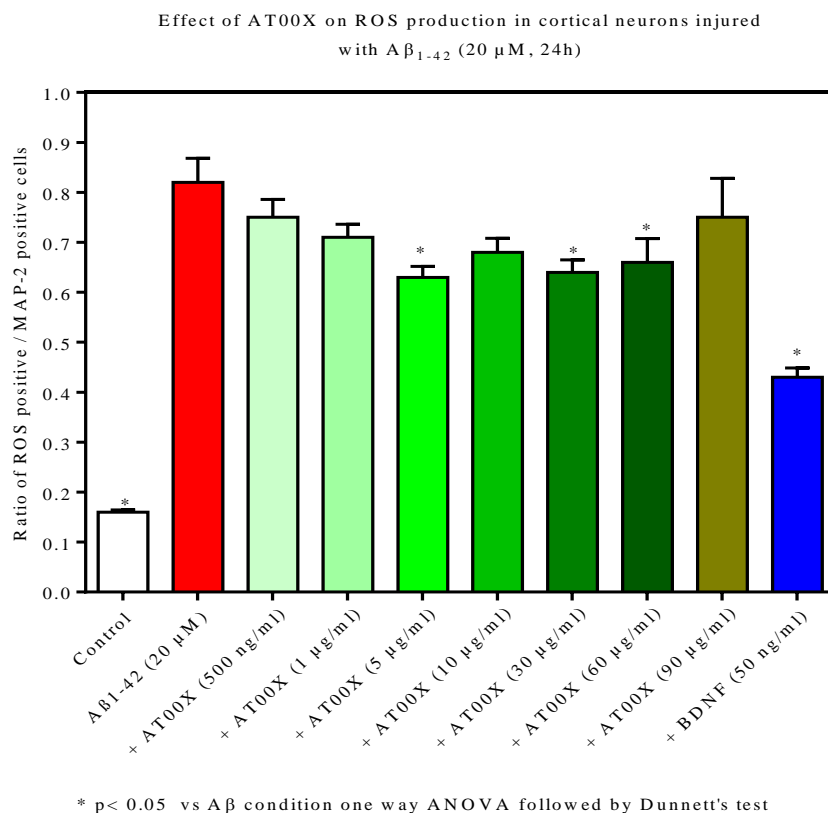
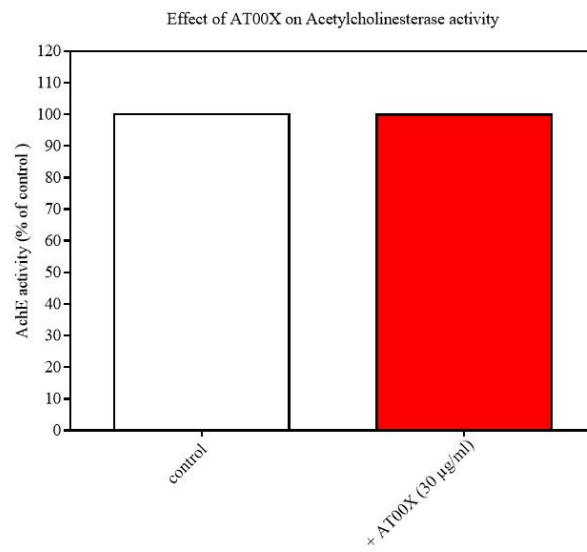


Fig. 49. Effet d'AT00X sur la production de ROS dans les neurones corticaux primaires de rat (MAP-2 positif) intoxiqués par le peptide $A\beta_{1-42}$ (24h, 20 μ M correspondant à 2 μ M de $A\beta$ O). Les données exprimées en pourcentage de contrôle montrent la moyenne \pm SEM (100% = pas de $A\beta$, pas de composé). ANOVA à un facteur suivie du test de Dunnett, $n = 4-6$. * $p < 0,05$ était considéré comme significatif.

Le peptide neurotoxique $A\beta_{1-42}$ a induit une augmentation importante et significative de ROS dans le cytoplasme des neurones, comme décrit précédemment (Callizot et al., 2013). AT00X ajouté 1h avant l'application du peptide, est capable de réduire la génération de ROS dans les neurones (~25% de réduction), l'effet est significatif pour 5, 30 et 60 μ g/mL (Fig. 49). Le BDNF utilisé comme standard a montré une réduction importante et significative de la production de ROS (cf annexe 4).

➤ Effet de l'extrait AT00X sur l'activité de l'Acétylcholinestérase



* $p < 0.05$ vs A β condition one way ANOVA followed by PLSD Fisher's test

Fig. 50. Effet d'AT00X sur l'activité de l'Acétylcholinestérase. Les données exprimées en pourcentage de contrôle montrent la moyenne \pm SEM (100% = pas de composé). Test T Fisher, * $p < 0,05$.

L'extrait AT00X (30 $\mu\text{g/mL}$) co-incubé avec l'Acétylcholinestérase n'a pas modifié l'activité de l'enzyme (Fig. 50).

5.2.3.9 Coloration des neurones et des neurites

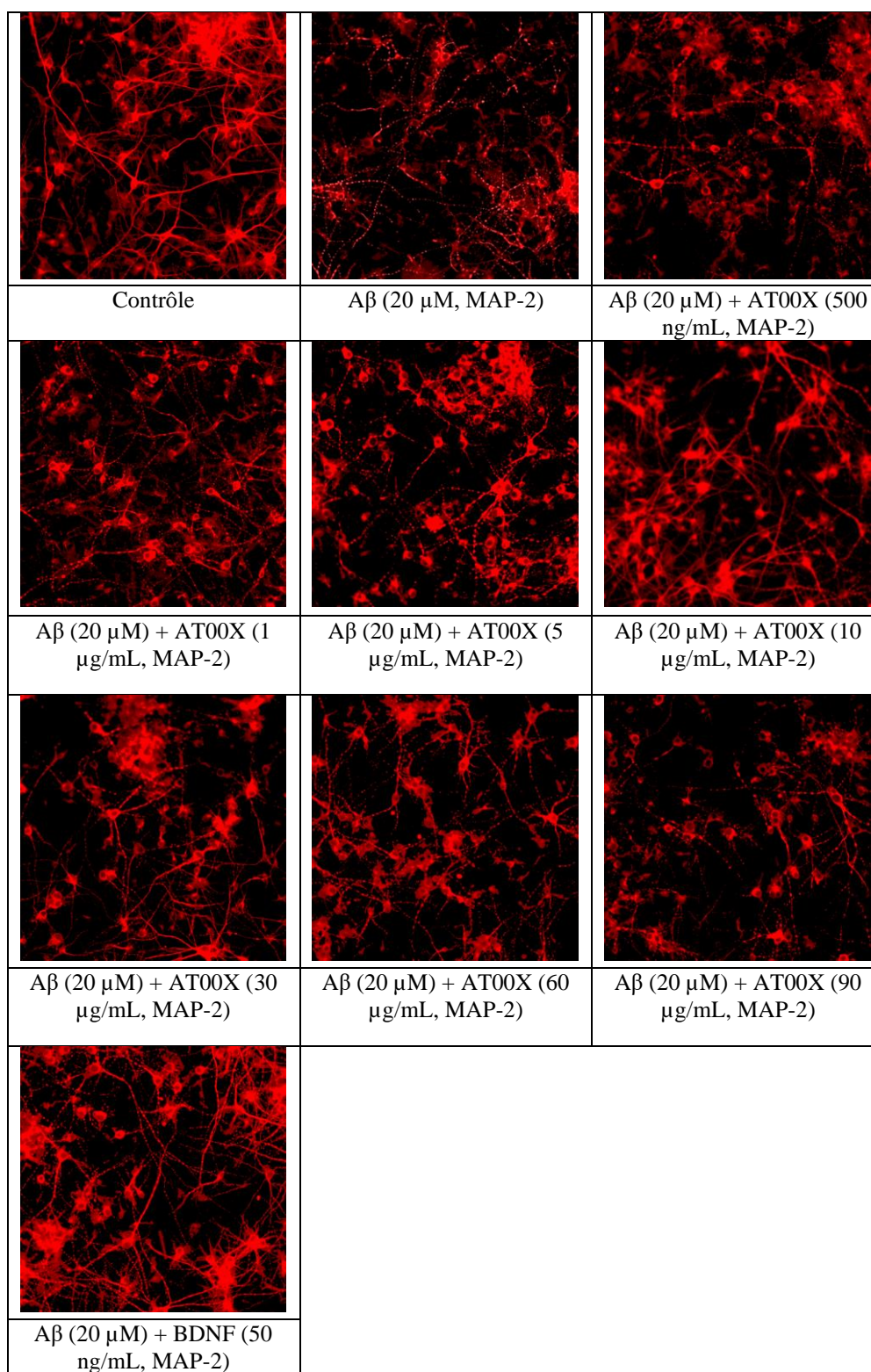


Fig. 51. Coloration des neurones et du réseau des neurites après traitement par l'extrait AT00X.

La coloration des neurones montre la mort des cellules après intoxication par le peptide Aβ (20 μM). Le traitement de l'extrait AT00X protège les neurones et améliore leur survie ainsi que la reconstitution de réseau des neurites (Fig. 51).

L'extrait AT00X ajouté 1h avant l'application du peptide $A\beta_{1-42}$ agit en tant que traitement préventif. A ce stade, et sans étude mécanistique, il est difficile de connaître le mode d'action de cette prévention et à quel niveau l'extrait agit. Des hypothèses sont émises pour comprendre le mode d'action :

- L'extrait agit en interférant avec les voies neurotoxiques du peptide (sur la libération de glutamate, l'activation de la GSK3b, et le stress mitochondrial).
- L'extrait agit en activant des voies de signalisation « pro-survival » donc il n'empêche pas le peptide $A\beta_{1-42}$ d'agir mais prévient la mort neuronale en activant des voies de survie du neurone.
- L'extrait agit en faisant libérer des facteurs pro-survie par les cellules gliales (pour rappel dans le modèle cellulaire nous avons 20 % d'astrocytes dans la culture).

Il a été démontré dans une étude sur le même modèle (Combes et al., 2015) que de faibles concentrations de $A\beta$ (à un niveau non toxique) induisaient une production importante de glutamate. Ces résultats suggèrent que le glutamate est impliqué dans le processus de dégénérescence induite par l' $A\beta$, et que l' $A\beta$ pourrait être un élément important déclenchant un événement d'excitotoxicité.

Ces résultats sont compatibles avec la notion que l'accumulation cérébrale d' $A\beta$ constitue l'influence primaire dans la maladie d'Alzheimer. Cette accumulation anormale déclenche les processus physiopathologiques suivants : la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires, l'oxydation et la peroxydation lipidique, l'excitotoxicité glutamatergique, l'inflammation et l'activation de la cascade de mort cellulaire apoptotique qui sont considérés comme des conséquences secondaires de la génération et du dépôt de l' $A\beta$ (Querfurth and LaFerla, 2010).

Nos résultats suggèrent, conjointement avec les résultats précédents, que le ciblage de l' $A\beta$ pourrait être une voie prometteuse dans la conception de nouveaux traitements de la maladie d'Alzheimer.

De nombreuses études ont rapporté l'effet neuroprotecteur de certaines plantes constituant l'extrait AT00X. Le traitement par l'extrait éthanolique de tubercules de *Cyperus rotundus* a montré un potentiel thérapeutique réparateur des troubles neurodégénératifs de la mémoire et du comportement produits par la lésion du noyau basal de Meynert (NBM) chez le rat (Rabiei et al., 2013).

Le prétraitement des neurones avec l'extrait de *Cyperus rotundus* améliore les dommages de la membrane mitochondriale et plasmique induits par la 3-morpholinosydnonimine (SIN-1),

restaure la morphologie cellulaire et améliore le statut antioxydant en régulant les biomarqueurs du stress oxydatif (Hemanth Kumar et al., 2013). Les flavonoïdes extraits du *Cyperus rotundus* ont démontré un effet neuroprotecteur contre la neurodégénérescence induite chez le modèle de rat en réduisant le stress oxydatif, l'excitotoxicité, les altérations neurologiques et comportementales (Sunil et al., 2011). Un traitement préalable avec un l'extrait alcoolique de racines de *Saussurea lappa* a réduit le taux de mortalité, ce qui indique une propriété anticonvulsive contre les convulsions induites par le pentylénétrazole et la picrotoxine chez les souris (Ambavade et al., 2009).

5.3 Conclusion sur les activités biologiques de l'extrait AT00X

Les résultats des tests d'évaluation des activités biologiques de l'extrait AT00X, montrent une grande capacité à retarder, voire à arrêter une chaîne de réactions oxydatives selon le test ORAC et un fort pouvoir antiradicalaire selon le test DPPH dans le but de prévenir la formation de dommages oxydatifs et de stabiliser les radicaux libres. Plusieurs tests doivent être réalisés afin de refléter la capacité antiradicalaire et antioxydante totale d'un échantillon. Dans ce but, nous avons eu recours au test KRL, technique biologique qui permet d'évaluer la capacité d'un produit à améliorer les défenses cellulaires préventivement à une agression radicalaire. L'extrait AT00X présente une forte activité antiradicalaire selon le test KRL. L'extrait AT00X présente un fort pouvoir anti-inflammatoire supérieur à celui de la dexaméthasone (contrôle positif), en inhibant la libération de NO à partir de macrophages murins stimulés par les LPS et en réduisant la cytotoxicité induite par le LPS. Également, l'extrait AT00X, atténue les déficits induits par le peptide neurotoxique A β ₁₋₄₂ in vitro améliorant ainsi la survie neuronale, le réseau des neurites et réduisant la production de ROS dans les neurones.

Conclusion

- Extrait AT00X : première version alimentaire
- Activités biologiques évaluées :
 - Activité antioxydante : DPPH = 3498 $\mu\text{g/mL}$, ORAC = 224010 $\mu\text{mol TE/100g}$, KRL = 54,21%, ABTS = 2819,2 $\mu\text{g/mL}$
 - Activité anti-inflammatoire : 99,13
 - Activité neuroprotectrice in vitro : dose efficace 5 $\mu\text{g/mL}$

6 PARTIE 3. OPTIMISATION DE L'EXTRAIT AT00X

Dans cette partie, nous allons optimiser les quantités des plantes qui constituent l'extrait équimassique AT00X en se basant sur l'activité antioxydante selon le test DPPH. Le nouvel extrait obtenu désigné par AT33X va subir les mêmes tests d'évaluation des activités biologiques mentionnés dans le chapitre précédent : antioxydation, anti-inflammation et neuroprotection in vitro. L'analyse chimique de l'extrait AT33X est évaluée également.

6.1 Introduction des plans d'expériences

Les plans d'expériences sont la science de l'organisation optimale des essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles et de la modélisation des résultats expérimentaux. Cette organisation permet d'obtenir le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences, et la meilleure précision possible sur la modalisation des résultats. Cette méthode des plans d'expériences est basée sur des règles mathématiques strictes et elle s'applique à de nombreuses disciplines à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt, y , et des variables X_i (Goupy, 1999).

L'expérimentateur qui lance une étude s'intéresse à une grandeur qu'il mesure à chaque essai. Cette grandeur s'appelle la réponse, c'est la grandeur d'intérêt. La valeur de la réponse dépend de plusieurs variables ou facteurs. Le premier facteur peut être représenté par un axe gradué et orienté (Fig. 52). La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée niveau. Lorsqu'on étudie l'influence d'un facteur, en général, on limite ses variations entre deux bornes. La borne inférieure est le niveau bas. La borne supérieure est le niveau haut.

L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, s'appelle le domaine de variation du facteur. Généralement, le niveau bas est noté par -1 et le niveau haut par $+1$ (Goupy, 2001).

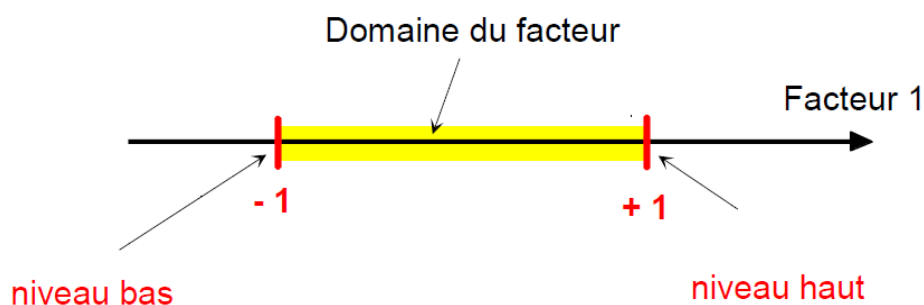


Fig. 52. Représentation des niveaux bas et haut d'un facteur ainsi que son domaine de variation.

S'il y a un second facteur, il est représenté, lui aussi, par un axe gradué et orienté, et par son domaine de variation. Ce second axe est disposé orthogonalement au premier. On obtient ainsi un repère cartésien qui définit un espace euclidien à deux dimensions. Cet espace est appelé l'espace expérimental (Fig. 53).

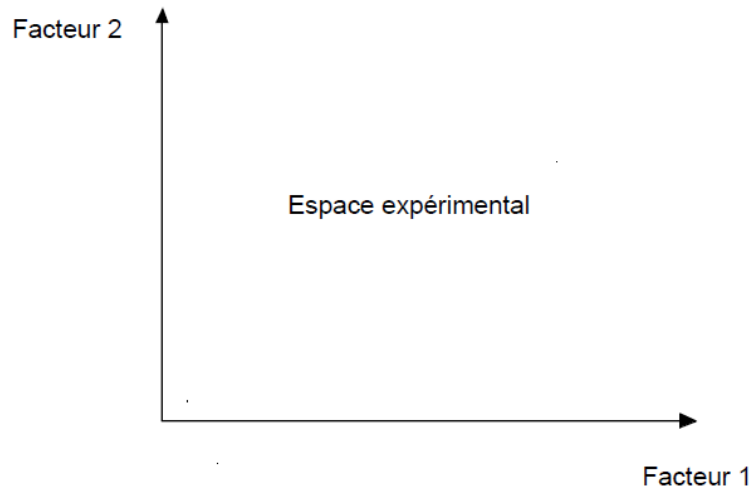


Fig. 53. Chaque facteur est représenté par un axe gradué et orienté. Les axes des facteurs sont orthogonaux entre eux. L'espace ainsi défini est l'espace expérimental.

Le niveau x_1 du facteur 1 et le niveau x_2 du facteur 2 peuvent être considérés comme les coordonnées d'un point de l'espace expérimental (Fig. 54). Une expérience donnée est alors représentée par un point dans ce système d'axes. Un plan d'expériences est représenté par un ensemble de points expérimentaux.

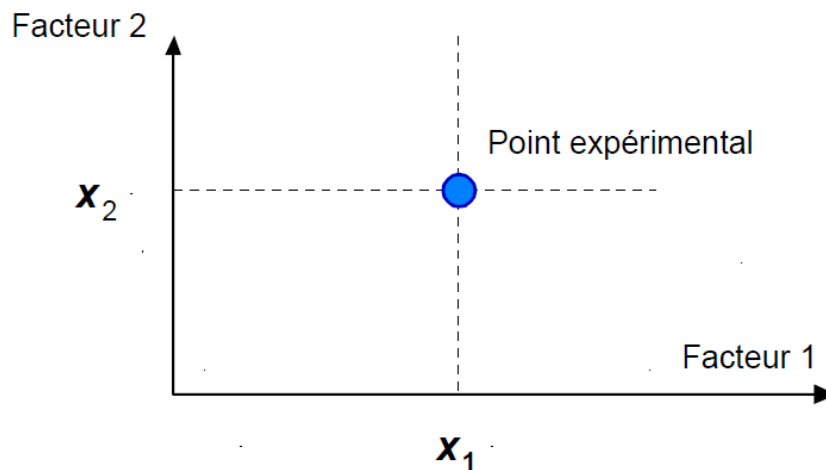


Fig. 54. Dans l'espace expérimental, les niveaux des facteurs définissent des points expérimentaux.

Le domaine d'étude est le regroupement des domaines des facteurs défini. Ce domaine d'étude est la zone de l'espace expérimental choisie par l'expérimentateur pour faire ses essais. Une étude, composée de plusieurs expériences bien définies, est représentée par des points

répartis dans le domaine d'étude (Fig. 55). La construction d'un plan d'expériences consiste à extraire du domaine expérimental, un nombre suffisant N de combinaisons particulières afin d'estimer, avec une incertitude à la fois minimale mais aussi homogène, les coefficients inconnus du modèle (additif ou polynomial) tout en respectant au mieux les contraintes techniques et économiques de l'étude.

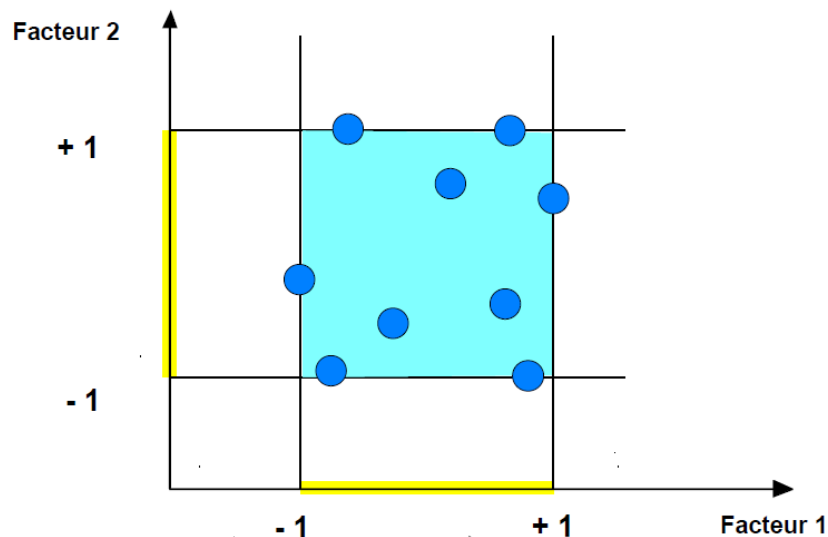


Fig. 55. Les points expérimentaux sont disposés dans le domaine d'étude défini par l'expérimentateur.

La méthode des plans d'expériences nécessite deux types d'études :

- L'étude de criblage ou screening : permet de déterminer, parmi les facteurs recensés par l'expérimentateur, ceux qui ont une influence statistiquement non négligeable sur les variations de la réponse. En plus des facteurs influents il est également possible d'identifier les interactions de facteurs qui auront une influence significative sur la réponse.
- L'étude de la méthodologie de surface de réponse : c'est une étude quantitative, dans le but étant de déterminer comment la réponse varie. Les variations de la réponse sont calculées en fonction des facteurs et interactions précédemment jugés influents.

6.2 Méthodologie des surfaces de réponse

La méthodologie des surfaces de réponse (MSR), est un ensemble de techniques mathématiques et statistiques ayant pour objectif d'analyser, à l'aide d'un modèle empirique, les relations entre plusieurs variables explicatives et une ou plusieurs variables de réponse

(Box and Wilson, 1951). L'idée principale de la MSR est d'utiliser une séquence d'expériences conçues pour obtenir une réponse optimale. Plus concrètement, ses objectifs sont les suivants :

- Générer des connaissances dans le domaine expérimental d'intérêt.
- Estimer de manière fiable la variabilité expérimentale.
- Garantir l'adéquation entre le modèle proposé et les données expérimentales.
- Prédire la réponse observée, en des points du domaine expérimental où aucune expérience n'a été réalisée.
- Proposer des stratégies séquentielles pour mener à bien l'expérimentation.
- Maintenir une efficacité élevée en matière de coût économique, de temps et de toute autre limitation pratique.
- Faciliter l'identification des données aberrantes.
- Rendre la prise de décision possible dans des conditions d'incertitude, en réduisant l'ambiguïté.

La conception expérimentale vise à décrire ou à expliquer la variation d'informations sous des conditions supposées reflétant ces variations. Le terme est généralement associé à des expériences dans lesquelles le plan introduit des conditions qui affectent directement la variation.

Dans sa forme la plus simple, une expérience vise à prédire le résultat en introduisant un changement des conditions préalables, qui est représenté par une ou plusieurs variables indépendantes, également appelées "variables d'entrée". La modification d'une ou de plusieurs variables indépendantes est généralement supposée entraîner une modification d'une ou plusieurs variables dépendantes, également appelées "variables de sortie". Le plan expérimental peut également identifier des variables de contrôle qui doivent être maintenues constantes pour empêcher des facteurs externes d'affecter les résultats. La conception expérimentale implique non seulement la sélection de variables indépendantes, dépendantes et de contrôle appropriées, mais aussi la planification de la réalisation de l'expérience dans des conditions statistiquement optimales, en fonction des contraintes de ressources. Les principales préoccupations dans la conception expérimentale incluent l'établissement de la validité, de la fiabilité et de la reproductibilité. Ces préoccupations peuvent être partiellement résolues en choisissant avec soin la variable indépendante, en réduisant le risque d'erreur de mesure et en veillant à ce que la documentation de la méthode soit suffisamment détaillée (Myers et al., 2004).

6.3 Optimisation de l'extrait AT00X

Dans cette étude, nous cherchons à connaître le comportement d'une réponse mesurée (variable dépendante) dans un domaine expérimental bien défini, que l'on observe lorsque l'on fait varier le facteur étudié (variable naturelle). Le facteur représenté par X , est la quantité en gramme des plantes constituant l'extrait, et la réponse est le résultat DPPH représenté par l' EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$).

La variation des quantités des plantes constituant l'extrait AT00X, est basée sur leur pouvoir antioxydant selon le test DPPH. L'idée est de sélectionner les plantes ayant le potentiel antioxydant le plus fort et de faire varier leurs quantités pour améliorer le pouvoir antioxydant global de l'extrait ainsi que l'activité neuroprotectrice. Le résultat du test DPPH des 9 plantes de l'extrait AT00X est classé dans le tableau suivant :

Tableau 11. Pouvoir antioxydant de l'extrait AT00X et de ses composantes végétales selon le test DPPH.

Extrait AT00X	DPPH EC₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
AT00X	3498
<i>Eugenia caryophyllata</i>	147,2
<i>Styrax benzoin</i>	537,6
<i>Cyperus rotundus</i>	1240,4
<i>Santalum album</i>	1774,9
<i>Aquilaria agallocha</i>	4432,3
<i>Boswellia carteri</i>	> 10000
<i>Liquidambar orientalis</i>	> 10000
<i>Saussurea lappa</i>	> 10000
<i>Cinnamomum camphora</i>	894

Selon les résultats du test DPPH (Tableau 11), nous avons retenu 5 plantes (facteurs) qui présentent un fort potentiel antioxydant : *Eugenia caryophyllata*, *Santalum album*, *Cyperus rotundus*, *Styrax benzoin* et *Aquilaria agallocha*. Les niveaux hauts et bas de chaque facteur sont définis comme suit :

La quantité de ces 5 plantes doit varier selon les limites suivantes :

X1 : $1 \text{ g} \leq \text{Eugenia caryophyllata} \leq 5 \text{ g}$

X2 : $1 \text{ g} \leq \text{Santalum album} \leq 2 \text{ g}$

X3 : $1 \text{ g} \leq \text{Cyperus rotundus} \leq 3 \text{ g}$

X4 : $1 \text{ g} \leq \text{Styrax benzoin} \leq 4 \text{ g}$

X5 : $1 \text{ g} \leq \text{Aquilaria agallocha} \leq 3 \text{ g}$

Nous avons fixé la quantité des 4 autres plantes à 1 g chacune. Le *Cinnamomum camphora* (Camphre), malgré son fort pouvoir antioxydant, ne doit pas dépasser 1 g dans la formulation à cause de sa toxicité neurologique (à partir de 50 mg/kg) (European Food Safety Authority (EFSA), 2008).

Les quantités des 5 plantes retenues sont modifiées selon le modèle polynomial du deuxième degré suivant :

$$\eta = \text{DPPH} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 + \beta_{55} X_5^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{15} X_1 X_5 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{25} X_2 X_5 + \beta_{34} X_3 X_4 + \beta_{35} X_3 X_5 + \beta_{45} X_4 X_5$$

Pour estimer les coefficients du modèle qui relie la variation du DPPH à la variation des quantités des plantes, nous avons réalisé un plan composite à faces centrées de 27 expériences. Comme nous désirons explorer le plus grand domaine d'étude possible, nous avons pris, pour chaque facteur, les bornes les plus élevées compatibles avec les contraintes de notre étude. Nous avons prévu également deux points centraux. Les résultats des expériences sont rassemblés dans le Tableau 12.

Tableau 12. Matrice composite du modèle.

N°Exp	<i>Eugenia caryophyllata</i> X ₁	<i>Santalum album</i> X ₂	<i>Cyperus rotundus</i> X ₃	<i>Styrax benzoin</i> X ₄	<i>Aquilaria agallocha</i> X ₅	DPPH EC ₅₀ (µg/mL)
1	1.0	1.0	1.0	1.0	3.0	5430
2	5.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1688
3	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	4689
4	5.0	2.0	1.0	1.0	3.0	1419
5	1.0	1.0	3.0	1.0	1.0	3624
6	5.0	1.0	3.0	1.0	3.0	1490
7	1.0	2.0	3.0	1.0	3.0	5091
8	5.0	2.0	3.0	1.0	1.0	1928
9	1.0	1.0	1.0	4.0	1.0	5170
10	5.0	1.0	1.0	4.0	3.0	1999
11	1.0	2.0	1.0	4.0	3.0	3597
12	5.0	2.0	1.0	4.0	1.0	1551
13	1.0	1.0	3.0	4.0	3.0	4850
14	5.0	1.0	3.0	4.0	1.0	3516
15	1.0	2.0	3.0	4.0	1.0	3402
16	5.0	2.0	3.0	4.0	3.0	2846
17	1.0	1.5	2.0	2.5	2.0	6581
18	5.0	1.5	2.0	2.5	2.0	3699
19	3.0	1.0	2.0	2.5	2.0	2731
20	3.0	2.0	2.0	2.5	2.0	4338
21	3.0	1.5	1.0	2.5	2.0	4635
22	3.0	1.5	3.0	2.5	2.0	4953
23	3.0	1.5	2.0	1.0	2.0	4797

24	3.0	1.5	2.0	4.0	2.0	3573
25	3.0	1.5	2.0	2.5	1.0	4227
26	3.0	1.5	2.0	2.5	3.0	5525
27	3.0	1.5	2.0	2.5	2.0	7621
28	3.0	1.5	2.0	2.5	2.0	4112
29	3.0	1.5	2.0	2.5	2.0	4771

L'expérience 27 a été supprimée parce qu'elle présente un résultat aberrant (7621 µg/mL différents du résultat des expériences 28 et 29). En se basant sur cette matrice, le modèle a été calculé :

$$DPPH = 4724.64 - 1238.77X_1 - 90.94X_2 + 84.55X_3 + 19.33X_4 + 136.22X_5 + 344.56X_1^2 - 1260.93X_2^2 - 1.43X_3^2 - 610.43X_4^2 + 80.56X_5^2 + 84.12X_1X_2 + 315.12X_1X_3 + 325.12X_1X_4 + - 188.25X_1X_5 + 176.12X_2X_3 - 314.62X_2X_4 + 100.75X_2X_5 + 211.87X_3X_4 + 153.75X_3X_5 - 115.50X_4X_5$$

6.3.1 Analyse graphique du modèle

Dans le contexte des plans d'expériences pour l'étude de la variation de la réponse en fonction des variables, et pour restituer de manière interprétable l'équation du modèle empirique, des plans de coupe sont réalisés en faisant varier à chaque fois 2 variables et en fixant les 3 autres au centre du domaine. Deux formes ont été employées : les surfaces de réponse et les courbes isoréponses. Seuls les plans les plus informatifs sont présentés ci-dessous.

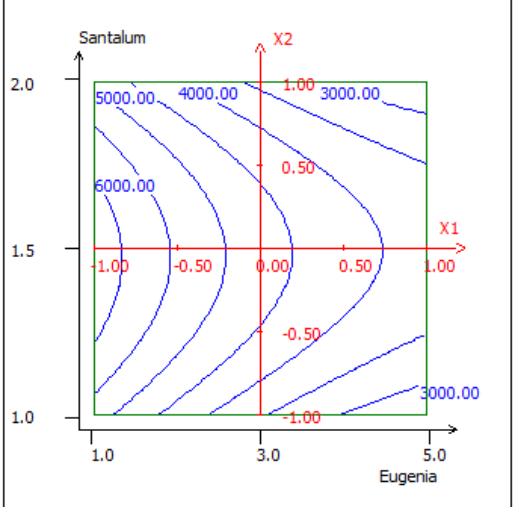
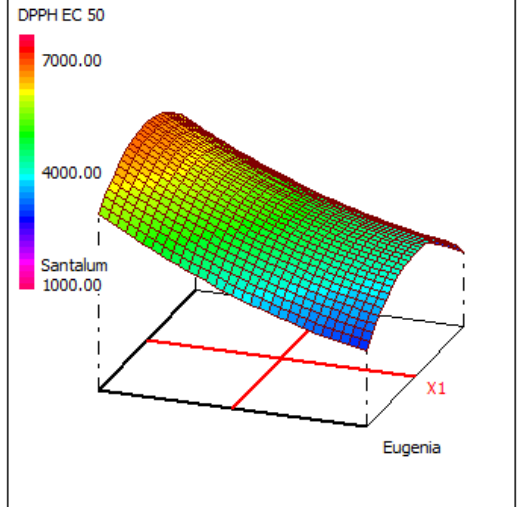
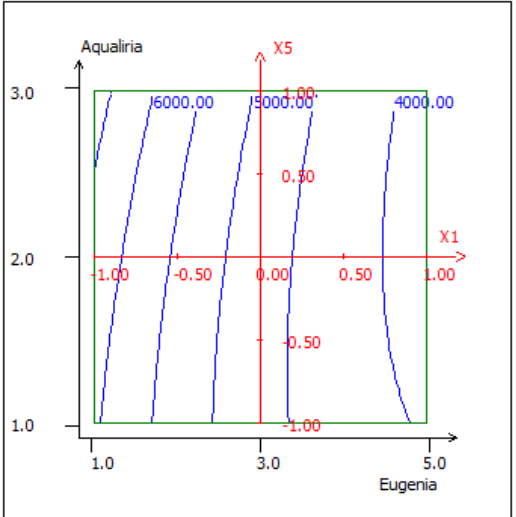
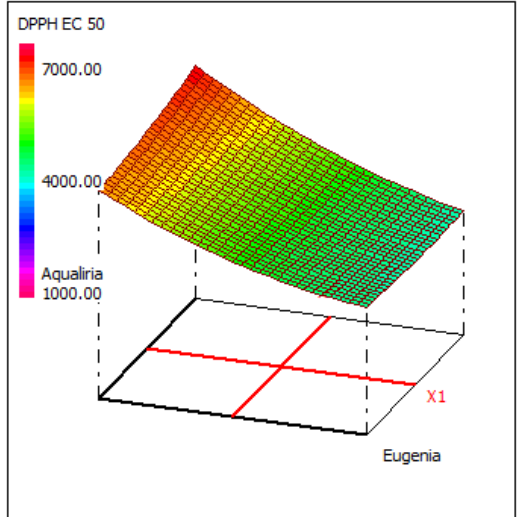
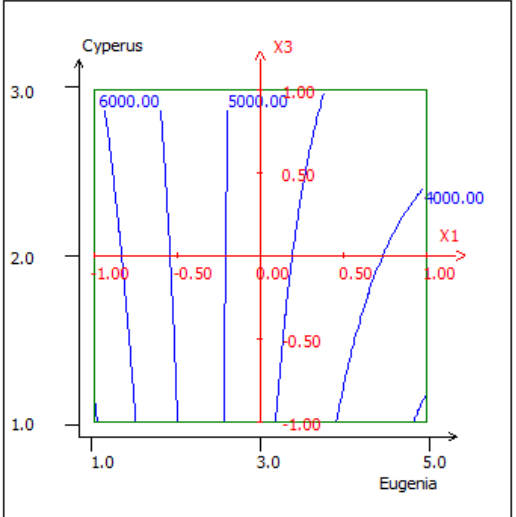
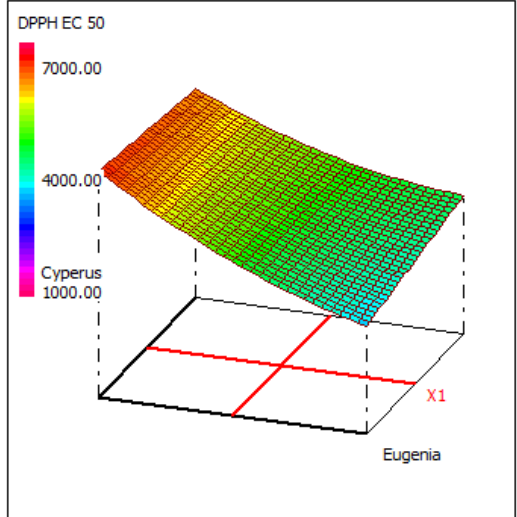
6.3.2 Surfaces de réponses

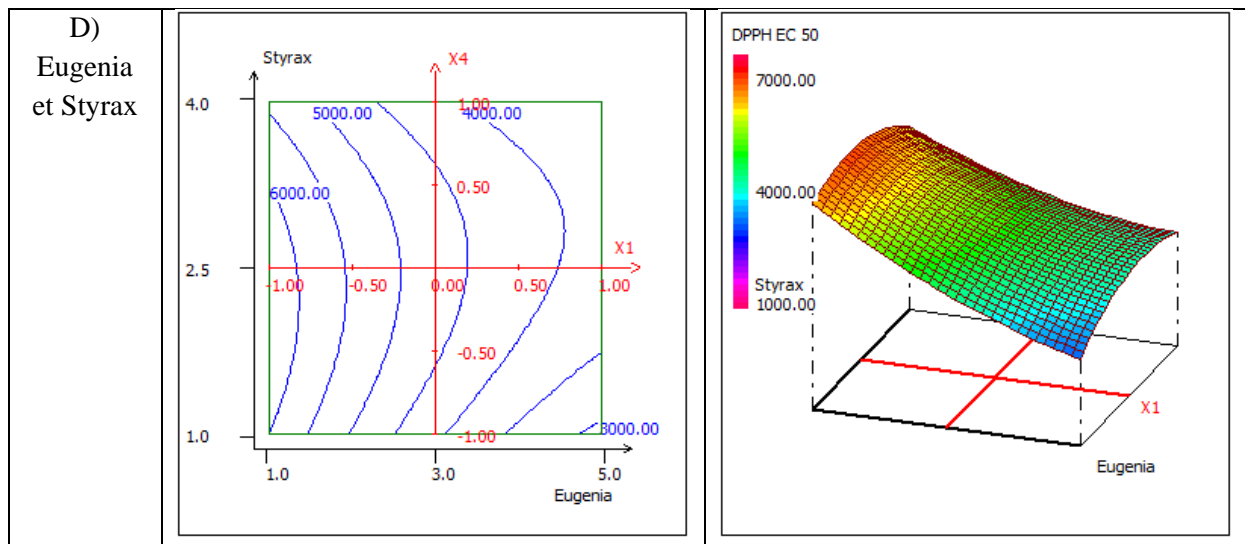
Les surface de réponses, matérialisent la surface de régression à partir d'un graphique dans un espace à trois dimensions. Le plan horizontal de la figure représente le domaine de variation de 2 facteurs ; l'axe vertical représente la variation de la réponse à partir du modèle.

6.3.3 Courbes isoréponses

Les courbes isoréponses constituent une projection de la surface de réponse tridimensionnelle, sur un plan horizontal à deux dimensions. Elles s'interprètent comme les courbes de niveaux, dessinées sur une carte topographique. Tout comme pour les surfaces de réponses, cette représentation ne fait intervenir que 2 facteurs à la fois, les autres devant être fixés à un niveau constant. La connaissance des courbes isoréponses permet de déterminer les conditions optimales dans le domaine expérimental.

Tableau 13. Variation de la réponse DPPH dans le plan en fonction de : A) Eugenia et Santalum, B) Eugenia et Aquilaria, C) Eugenia et Cyperus, D) Eugenia et Styrax.

Variables	Courbes isoréponses	Surfaces de réponses
<p>A) Eugenia et Santalum</p>		
<p>B) Eugenia et Aquilaria</p>		
<p>C) Eugenia et Cyperus</p>		



Le Tableau 13, représente les surfaces de réponses associées au modèle de DPPH. Nous avons choisi de présenter la variation du DPPH en fonction de l'*Eugenia caryophyllata*, le *Santalum album* et l'*Aquilaria agallocha*. Les autres facteurs étant fixés à des valeurs respectant le domaine expérimental. Les valeurs de la surface, sont représentées par diverses couleurs et courbes structurées. Les axes x et y représentent la variation des 2 facteurs Eugenia (X1) et Santalum (X2) respectivement (Tableau 13.A). L'axe z, représente la variation de la valeur du DPPH en fonction des 2 facteurs étudiés. Les courbes bleues d'isoreponses relient tous les mélanges possibles pour lesquelles la valeur du DPPH est la même. Les surface de réponse permettent de mieux visualiser la variation de la réponse dans un plan tridimensionnelle, selon une échelle colorimétrique.

Selon les plans de coupes, le comportement global de la réponse (DPPH EC₅₀ exprimé en µg/mL), varie en fonction de la quantité d'*Eugenia caryophyllata*. En effet, l'augmentation de la quantité d'*Eugenia caryophyllata* entraîne une diminution de la EC₅₀ et donc l'amélioration du pouvoir antioxydant détectable par le changement de couleur de l'orange vers le bleu (Tableau 13.A). Pour une quantité maximale d'Eugenia (5 g), le Santalum, l'Aquilaria, le Cyperus et le Styrax jouent un rôle dans le maintien d'un fort pouvoir antioxydant à une faible quantité (1g) (Tableau 13.C, D). L'augmentation des autres variables n'a quasiment aucun effet sur la diminution de la réponse.

6.4 Fonctions de désirabilité

Il s'agit ici, de trouver une méthode de recherche du meilleur réglage des facteurs, permettant d'atteindre un compromis entre plusieurs réponses. Il convient dans le cas d'une optimisation, de procéder à une transformation des réponses afin de les rendre comparables. On utilise ici les fonctions de désirabilité qui facilitent, grâce à des représentations graphiques simples, l'interprétation de ces transformations mathématiques (Derringer and Suich, 1980). La désirabilité traduit le degré de satisfaction des expérimentateurs, en fonction du niveau de la réponse modélisée après lui avoir donné une valeur cible à atteindre.

Dans le but de définir la formule optimale, une étude de désirabilité a été menée, qui consiste à rechercher le niveau des facteurs qui permet d'atteindre le maximum de la fonction de désirabilité globale. Cette recherche se fait de manière itérative dans les logiciels en fonction de l'intervalle de la réponse souhaitée. Dans notre cas, la valeur cible choisie est une EC_{50} inférieure à 1500 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 56).

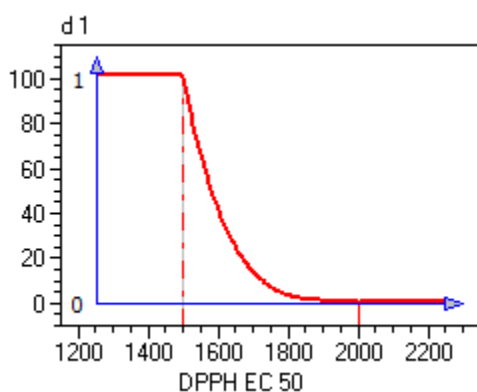


Fig. 56. Graphe des fonctions de désirabilité.

En fonction de cette étude de désirabilité, la formule optimale trouvée est présentée dans le tableau suivant :

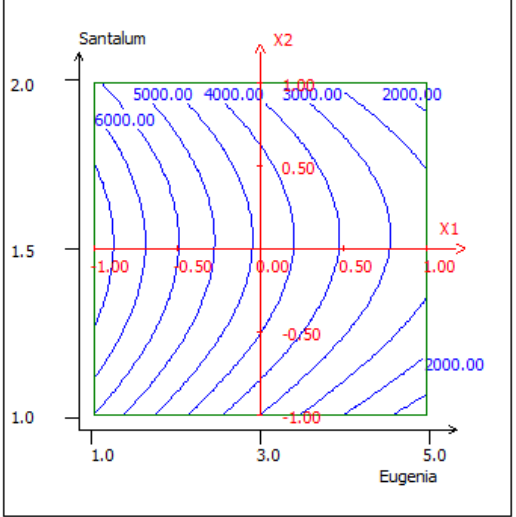
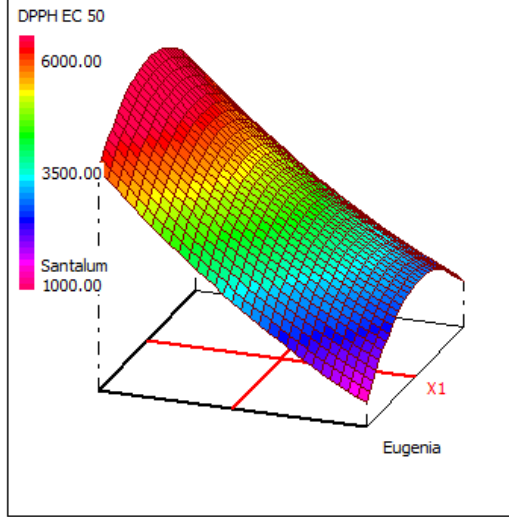
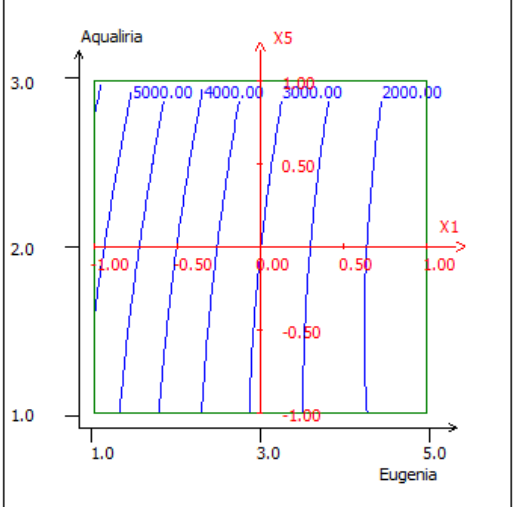
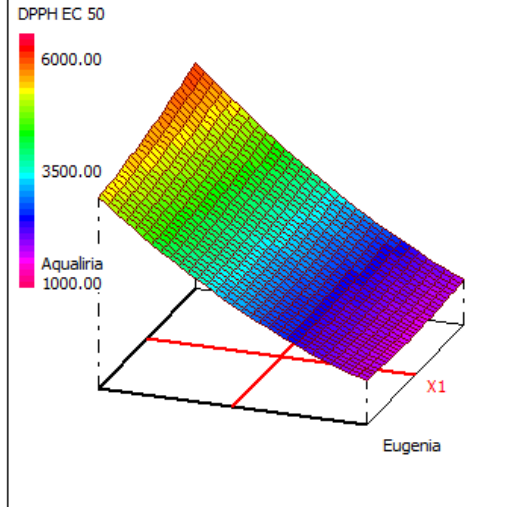
Tableau 14. Coordonnées et Caractéristiques du maximum/optimum selon l'étude de désirabilité.

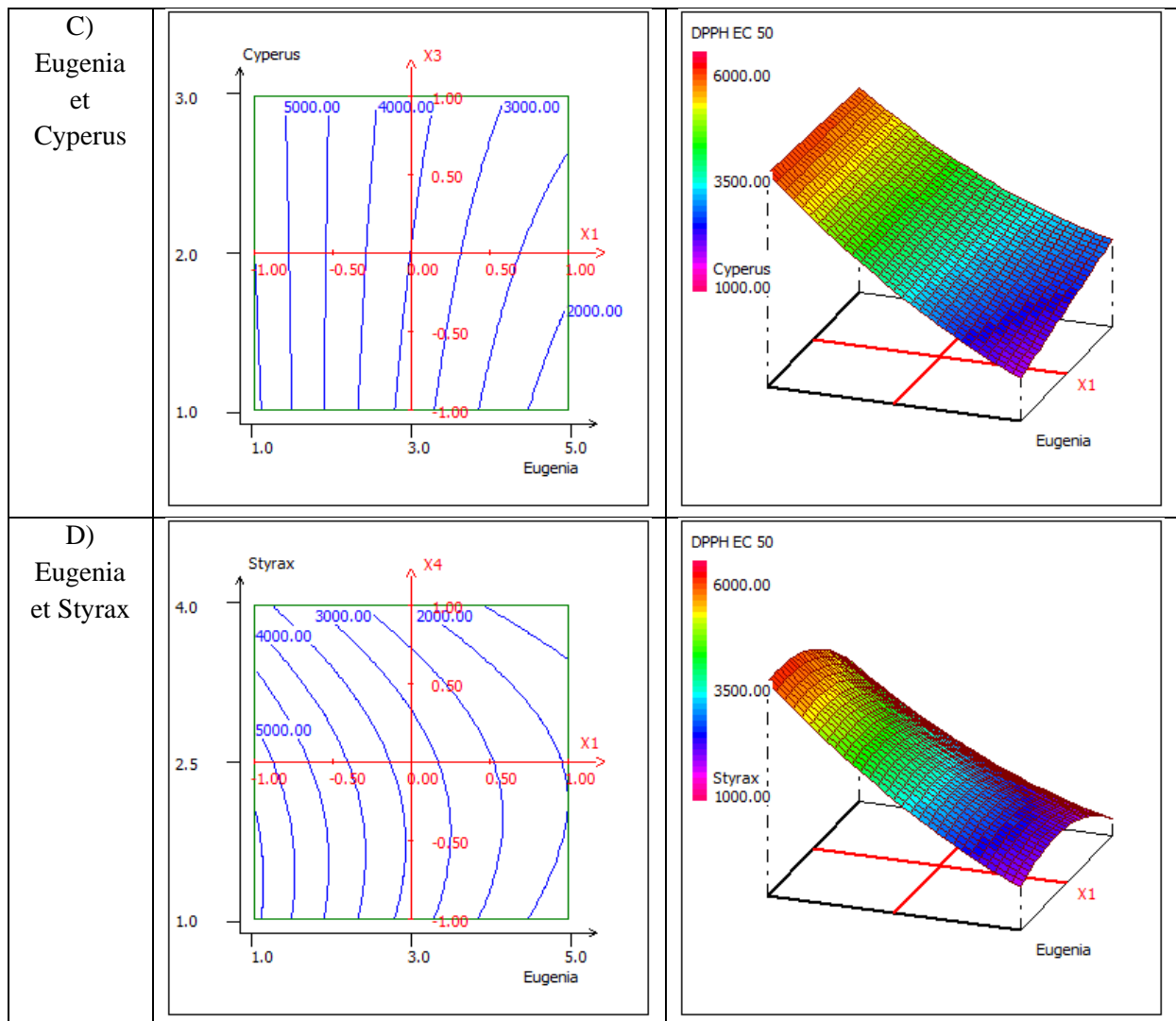
Variable	Valeur	Facteur	Valeur
X1	1	Eugenia	5.0
X2	1	Santalum	2.0
X3	-1	Cyperus	1.0
X4	-1	Styrax	1.0
X5	1	Aquilaria	3.0
Réponse	Nom	Valeur	di%
Y1	DPPH EC_{50}	1648.08	70.38

Le résultat de recherche de l'optimum selon l'étude de désirabilité menée par le logiciel, conduit à une valeur de la réponse de 1648,08 $\mu\text{g/mL}$ avec un pourcentage de désirabilité de 70,38 % (Tableau 14). Nous avons testé expérimentalement cette formule optimale, on obtient une valeur de DPPH de 1419 $\mu\text{g/mL}$. Compte tenu de l'erreur expérimentale, calculée à partir des points répétés dans le plan d'expériences (expériences 28 et 29), on valide le modèle mathématique qui permet de relier la valeur du DPPH à la variation des 5 variables (quantité des plantes).

L'optimisation graphique du résultat de cette désirabilité, est représentée par des surfaces de réponse et des courbes isoréponses réalisées en fonction de l'optimum obtenu : (chaque variable est fixée à son niveau optimal).

Tableau 15. Surfaces de réponses et courbes isoréponses de la variation du DPPH en fonction de l'optimum des 5 variables : A) Eugenia et Santalum, B) Eugenia et Aquilaria, C) Eugenia et Cyperus, D) Eugenia et Styra.

Variables	Courbes isoréponses	Surfaces de réponses
A) Eugenia et Santalum		
B) Eugenia et Aquilaria		



L'*Eugenia caryophyllata* (variable X1) est responsable de l'amélioration de l'activité antioxydante globale de l'extrait. Les représentations graphiques (surfaces de réponses et courbes isoréponses) de la formule optimale valident que plus on augmente la quantité d'*Eugenia caryophyllata*, plus l' EC_{50} exprimée en $\mu\text{g/mL}$ diminue favorisant ainsi l'amélioration de l'activité antioxydante globale de l'extrait (couleur bleu-violet). Une quantité minimale des variables : *Cyperus rotundus* (X3) et *Styrax benzoin* (X4) est suffisante pour préserver ce fort pouvoir antioxydant. Quant aux *Santalum album* (X2) et *Aquilaria agallocha* (X5), un haut niveau de ces 2 variables qui correspond à 2 g et 3 g respectivement est nécessaire pour avoir cet effet antioxydant optimal de l'extrait (Tableau 15).

La formule 4 constitue le meilleur état des variables pour obtenir une réponse optimale. Selon les plans des coupes, en augmentant la quantité d'*Eugenia caryophyllata*, nous favorisons la diminution de la EC_{50} et donc l'amélioration du pouvoir antioxydant. À partir de la formule 4,

pour optimiser davantage et pour des raisons économiques, nous avons décidé de diminuer la quantité du *Santalum album* et d'augmenter la quantité de l'*Eugenia caryophyllata*. Dans ce but, nous avons ajouté les 4 matrices suivantes :

Tableau 16. Les 4 matrices ajoutées pour améliorer les résultats DPPH.

N°Exp	Eugenia	Santalum	Cyperus	Styrax	Aquilaria	Liquidambar	Saussurea	Boswellia	Camphre	DPPH EC ₅₀ (µg/ml)
30	5.0	1.0	1.0	1.0	3.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1416
31	6.0	1.0	1.0	1.0	3.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1350
32	7.0	1.0	1.0	1.0	3.0	1.0	1.0	1.0	1.0	995
33	8.0	1.0	1.0	1.0	3.0	1.0	1.0	1.0	1.0	704

Selon la matrice 30, la diminution de la quantité de Santalum n'affecte pas la EC₅₀, d'où l'intérêt de passer de 2 g à 1 g pour des raisons économiques. L'augmentation à chaque fois d'1 g d'Eugenia dans les matrices 31, 32 et 33 provoque une diminution de la EC₅₀ en passant de 1350 à 995 à 874 µg/mL respectivement. Ce résultat valide le modèle du plan composite utilisé pour l'optimisation. La formule 33 retenue sera nommée dans la suite AT33X (Tableau 16).

6.5 Contrainte réglementaire et extrait AT33B

En fin de l'année 2017, la pharmacopée française a listé une des plantes qui constitue l'extrait ; la *Saussurea lappa* dans la liste B : « Plantes médicinales utilisées traditionnellement en l'état ou sous forme de préparation dont les effets indésirables potentiels sont supérieurs au bénéfice thérapeutique attendu ». D'autant plus qu'en vertu du décret n° 2008-839, les compléments alimentaires contenant des plantes de la liste B ne peuvent pas être vendus par des personnes autres que des pharmaciens (voir annexe 1). Afin de respecter la politique d'AROMA THERAPEUTICS et de LAPHAL INDUSTRY, nous avons reformulé un nouvel extrait en éliminant la *Saussurea lappa* de la composition tout en gardant les nouvelles proportions des plantes de la formule optimisée AT33X. la nouvelle formule de l'extrait sera désignée par AT33B.

Dans la partie suivante, nous allons évaluer les propriétés biologiques des 2 versions de l'extrait : AT33X et AT33B et présenter les résultats correspondants.

La composition de l'extrait AT33B est la suivante :

- *Eugenia caryophyllata* : 8g
- *Santalum album* : 1g
- *Cyperus rotundus* : 1g
- *Styrax benzoin* : 1g
- *Aquilaria agallocha* : 3g
- *Liquidambar orientalis* : 1g
- *Boswellia carteri* : 1g
- *Cinnamomum camphora* : 1g

6.6 Évaluation des activités biologiques des extraits AT33X et AT33B

L'extrait AT33X constitue la première version optimisée de l'extrait original AT00X et l'extrait AT33B constitue la 2^{ème} version optimisée après avoir éliminé la *Saussurea lappa*. Afin de valider le modèle utilisé pour l'optimisation, Les activités antioxydante, anti-inflammatoire des extraits AT33X et AT33B ont été évaluées selon les mêmes protocoles décrits dans la partie précédente.

6.6.1 Résultat du test DPPH des extraits AT33X et AT33B

Tableau 17. Résultats du test DPPH des extraits AT33X et AT33B par rapport au Trolox, Acide ascorbique et Gallate de propyle.

Échantillons	DPPH EC ₅₀ (µg/mL)
AT00X	3498
AT33X	704
AT33B	874
Trolox	298
Acide ascorbique	196
Gallate de propyle	65

Nous remarquons que l'activité antioxydante a été améliorée en passant de 3498 à 874 µg/mL (Fig. 57). Cette amélioration doit être validée pour l'activité anti-inflammatoire et l'activité neuroprotectrice.

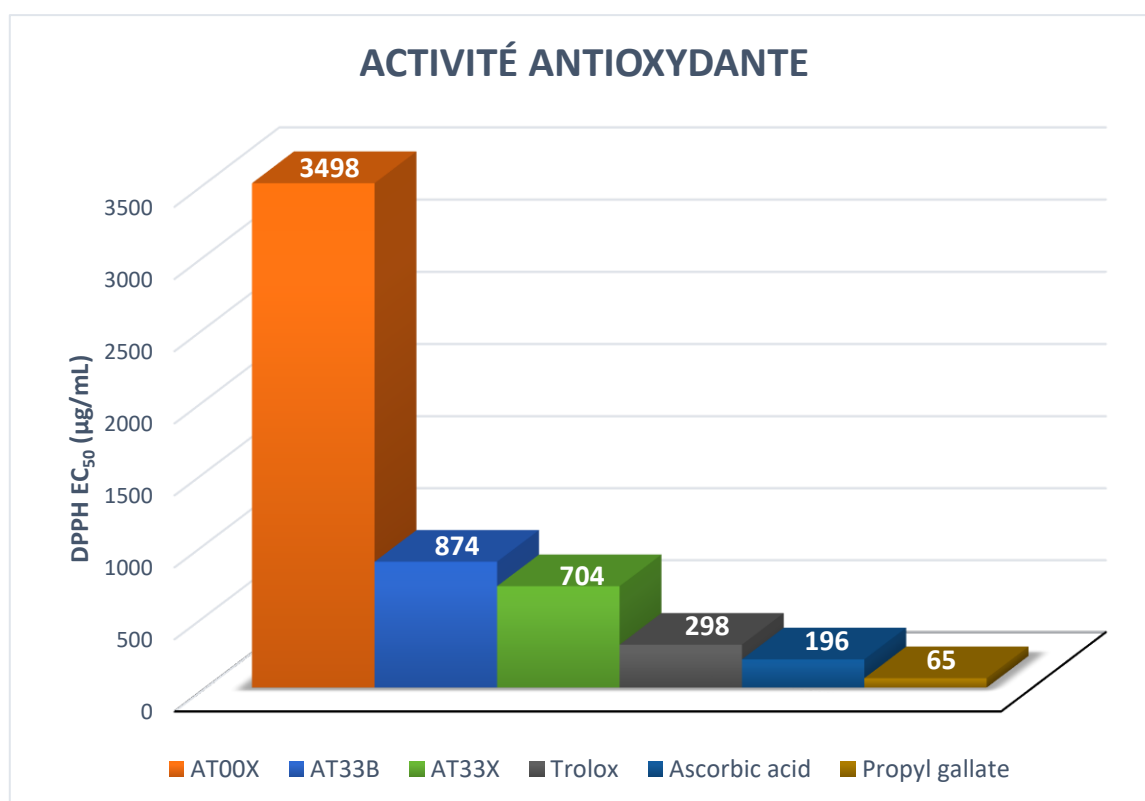


Fig. 57. Activité antioxydante selon le test DPPH des extraits optimisés AT33X et AT33B.

6.6.2 Résultat du test ORAC de l'extrait AT33B

Tableau 18. Valeur du pouvoir antioxydant de l'extrait AT33B exprimée en $\mu\text{mol}/100\text{ g}$.

Échantillons	Equivalent Trolox ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)
AT33B	391800
AT00X	224010

Le pouvoir antioxydant de l'extrait AT33B selon le test ORAC a été amélioré en passant de 224010 à 391800 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ (Tableau 18).

6.6.3 Résultat du test KRL des extraits AT33X et AT33B

Tableau 19. Pouvoir antiradicalaire des extraits AT33X et AT33B selon le test KRL.

Concentrations (mg/L) *	Pouvoir antiradicalaire de l'extrait (% d'augmentation du $T_{1/2}$ hémolyse du sang témoin)	
	Extrait AT33X	Extrait AT33B
0	0,00	0,00
1	9,02	8,77
2	19,76	13,51
5	44,11	33,57
10	88,63	69,69
20	138,67	120,85
50	196,31	172,76
100	264,00	232,63

* : Concentration en mg d'extrait par litre de milieu réactionnel

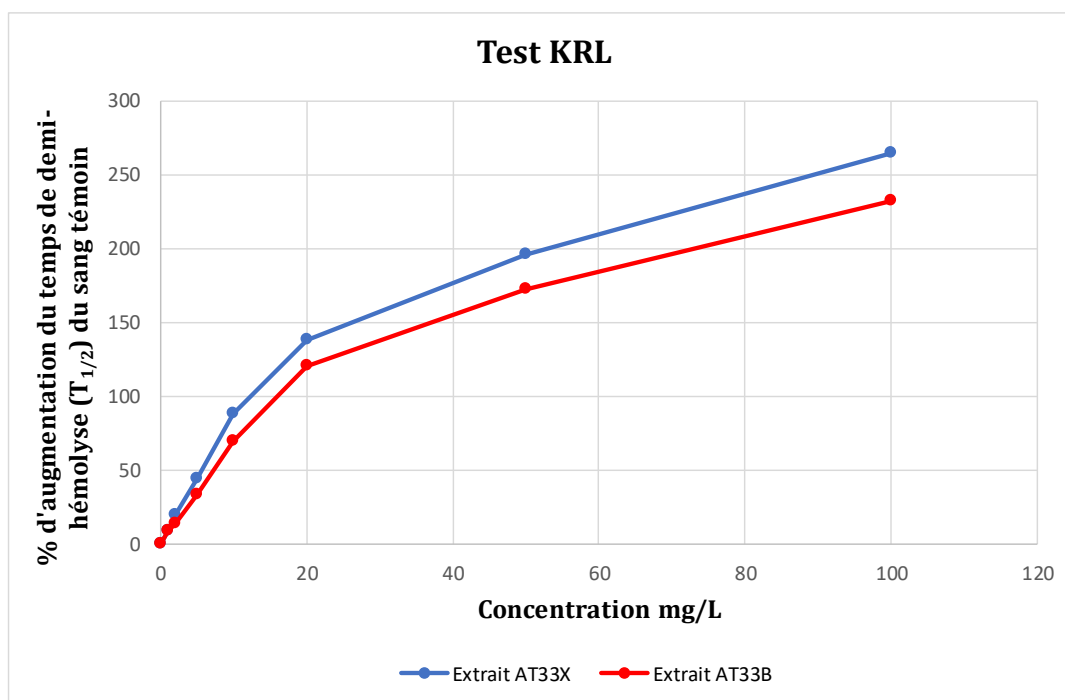


Fig. 58. Graphe représentant l'augmentation du $T_{1/2}$ hémolyse du sang témoin selon le test KRL.

Tableau 20. Equivalents mg de Trolox et mg d'acide gallique/g d'extrait.

Concentration (100 mg/L) *	POUVOIR ANTIRADICALAIRE Equivalents mg de Trolox et mg d'acide gallique/g d'extrait	
	Trolox	Acide gallique
AT33X	834,86	416,35
AT33B	735,64	366,86

* : Concentration en mg d'extrait par litre de milieu réactionnel

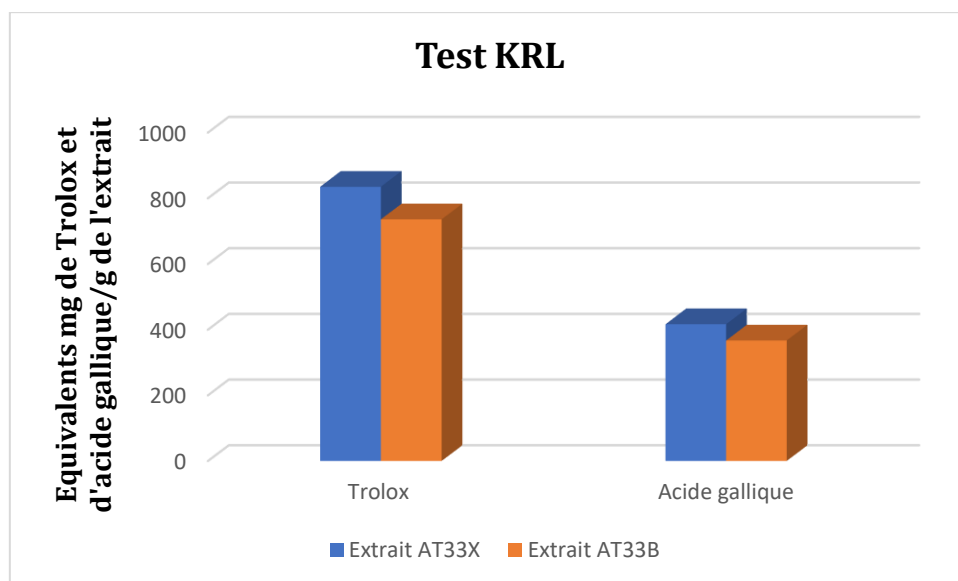


Fig. 59. Graphe représentant les équivalents mg de Trolox et mg d'acide gallique/g d'extrait.

Les résultats du test KRL indiquent que les extraits AT33X et AT33B présentent une capacité antiradicalaire dépendante de la dose et que ce pouvoir antioxydant est fortement croissant dans une gamme de concentrations de 0 à 100 mg/L de milieu réactionnel (Fig. 58). Ainsi à une concentration de 100 mg/L, les extraits AT33X et AT33B augmentent la résistance du sang témoin à une attaque radicalaire jusqu'à 264% et 232% respectivement (Tableau 19). Dans ces conditions in vitro, un gramme des extraits AT33X et AT33B présente une capacité antioxydante respectivement équivalente à 834,86 mg et 735,64 mg de Trolox® ou à 416,35 mg et 366,86 mg d'acide gallique (Tableau 20).

6.6.4 Résultat du test ABTS de l'extrait AT33B

Tableau 21. Valeur de la EC₅₀ du test ABTS de l'extrait AT33B.

Échantillons	ABTS EC ₅₀ (µg/mL)
AT00X	2819,2
AT33B	823,67
Trolox	793,5

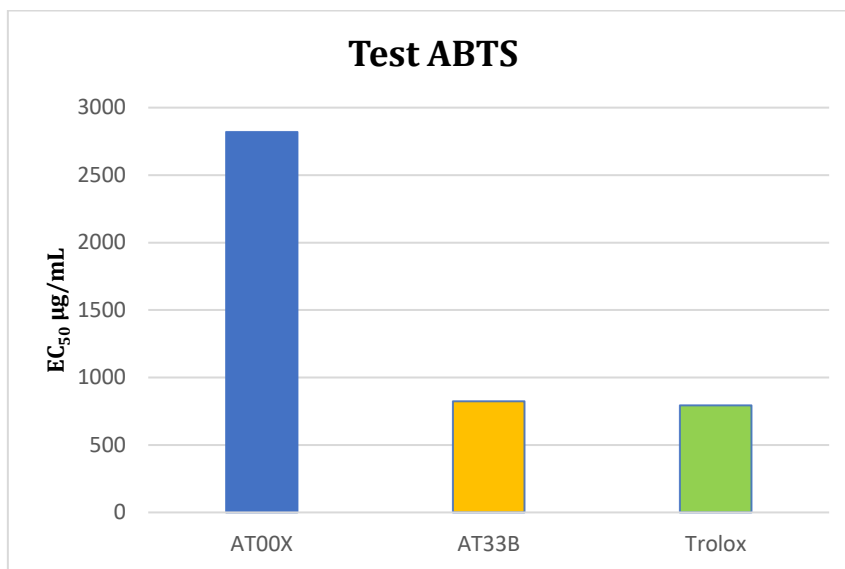


Fig. 60. Résultat du test ABTS de l'extrait AT33B.

Le résultat du test ABTS illustré dans la figure 60, montre une amélioration du pouvoir antioxydant de l'extrait AT33B par rapport à l'extrait référence AT00X avec une diminution de la EC₅₀ de 2819,2 à 823,67 µg/mL (Tableau 21).

6.6.5 Résultat de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire (AT33X et AT33B)

Tableau 22. Activité anti-inflammatoire et cytotoxique des extraits AT33X et AT33B par rapport à la Dexaméthasone.

	NO release IC ₅₀ (µM ou µg/mL)	Toxicity IC ₅₀ (µM ou µg/mL)	Anti-inflammatory ratio
AT00X	0,81	80,30	99,13
AT33X	0,25	> 100	> 400
AT33B	0,31	128,35	414
Dexamethasone	4,31 ± 1,45 µM	163,22 ± 74,96 µM	37,87

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait AT33B présente une amélioration par rapport à l'extrait AT00X avec un ratio anti-inflammatoire passant de 99,13 à 414 (Tableau 22).

6.6.6 Résultat de l'activité neuroprotectrice in vitro de l'extrait AT33B

L'évaluation de l'activité neuroprotectrice in vitro de l'extrait AT33B est évaluée en fonction de la survie neuronale, le réseau des neurites et la production des ROS, ainsi que l'évaluation de l'activité de l'acétylcholinestérase selon le même protocole de la partie précédente.

- L'effet de l'extrait AT33B sur la survie des neurones corticaux chez le rat et sur le réseau de neurites en présence du peptide $A\beta_{1-42}$ après 24 heures d'application

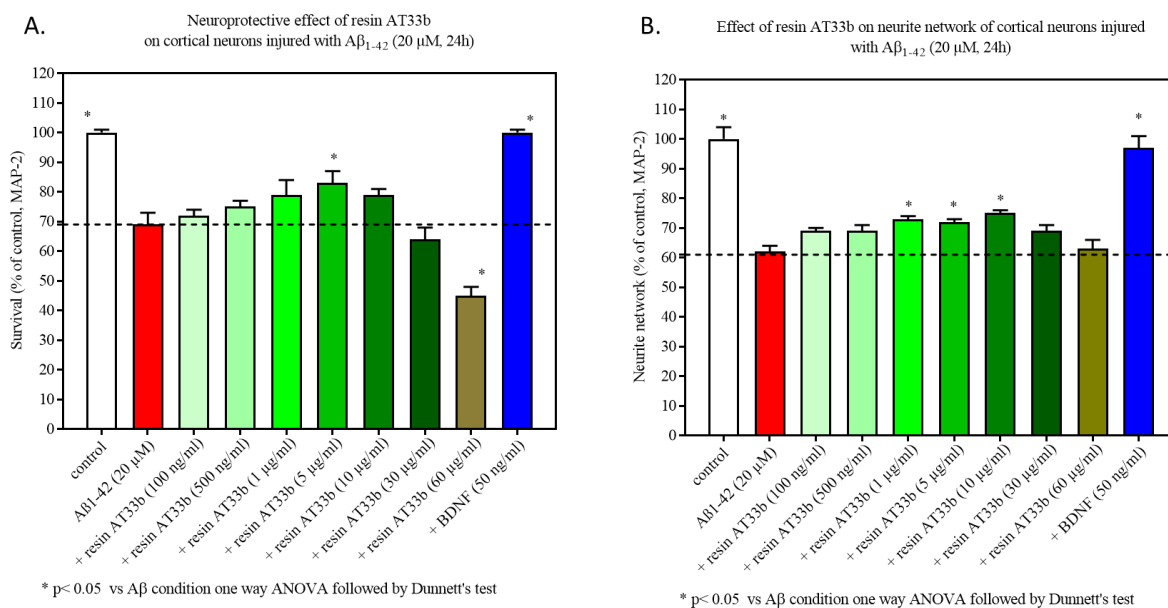


Fig. 61. Effet de l'extrait AT33B sur la survie des neurones (A) et le réseau de neurites (B) des neurones corticaux MAP-2. Le BDNF a été utilisé comme contrôle positif. Les données exprimées en pourcentage de contrôle montrent la moyenne \pm SEM. ANOVA à un facteur suivie du test de Dunnett. * $p < 0,05$ était considéré comme significatif.

Comme prévu et déjà montré (Callizot et al., 2013), l'intoxication par $A\beta_{1-42}$ a diminué de manière significative la survie des neurones MAP-2, par rapport au groupe témoin (Fig. 61A). Le BDNF, utilisé ici comme contrôle positif, a complètement inversé la mort des cellules neuronales induite par le glutamate. Une augmentation de la survie neuronale a été observée sous application de l'extrait AT33B (5 μ g/mL). Cependant, la dose la plus élevée d'AT33B (60 μ g/mL) a déclenché une neurotoxicité supplémentaire. D'autres doses d'AT33B n'ont pas eu d'impact significatif sur la survie neuronale.

De même, l'intoxication par $A\beta_{1-42}$ a considérablement réduit le réseau de neurites des neurones MAP-2. Cette toxicité a été complètement inversée après l'application du BDNF. L'extrait AT33B possède un effet protecteur sur le réseau de neurites avec des doses allant de

1 $\mu\text{g/mL}$ à 10 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 61B). Nous n'avons observé aucune toxicité lors de l'application d'AT33B sur le réseau de neurites.

- L'effet de l'extrait AT33B sur la production de ROS dans les neurones corticaux de rat en présence du peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ après 24 heures d'application

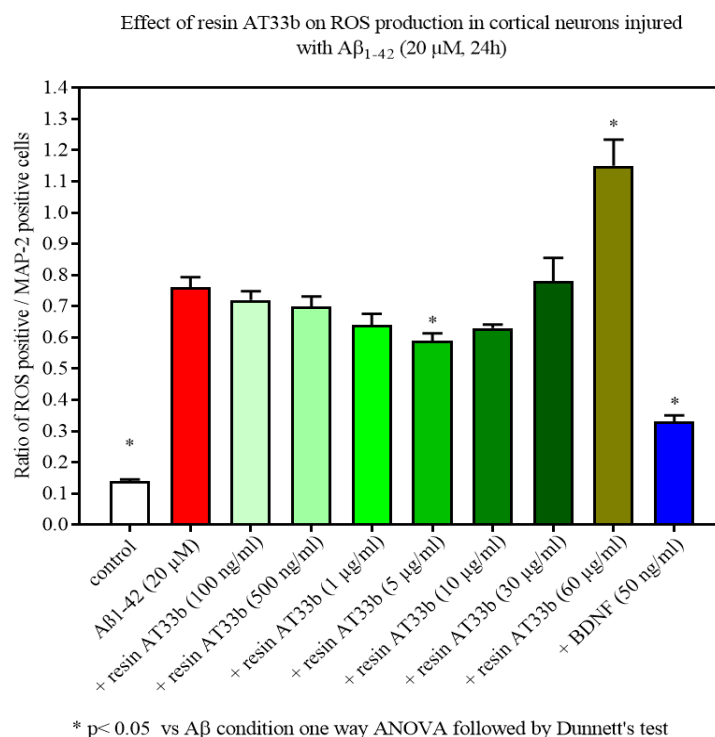


Fig. 62. Effet de l'extrait AT33B sur la production de ROS dans une culture primaire mixte de neurones corticaux. Le BDNF a été utilisé comme contrôle positif. Les données ont été exprimées en pourcentage de contrôle en moyenne \pm SEM. ANOVA à un facteur suivie du test de Dunnett. * $p < 0,05$ était considéré comme significatif.

Une augmentation importante et significative de la quantité de ROS a été détectée après une intoxication par $\text{A}\beta_{1-42}$. Le BDNF a partiellement neutralisé la production de ROS après une intoxication.

En fonction de la dose utilisée, l'application de l'extrait AT33B a montré des résultats différents. Un effet bénéfique modéré est présent après l'application d'AT33B lorsqu'il est utilisé à 5 $\mu\text{g/mL}$. D'autre part, à 60 $\mu\text{g/mL}$, AT33B a encore augmenté la production de ROS. D'autres doses d'AT33B n'ont pas eu d'incidence sur la production de ROS (Fig. 62).

➤ Effet de l'extrait AT33B sur l'activité de l'Acétylcholinestérase

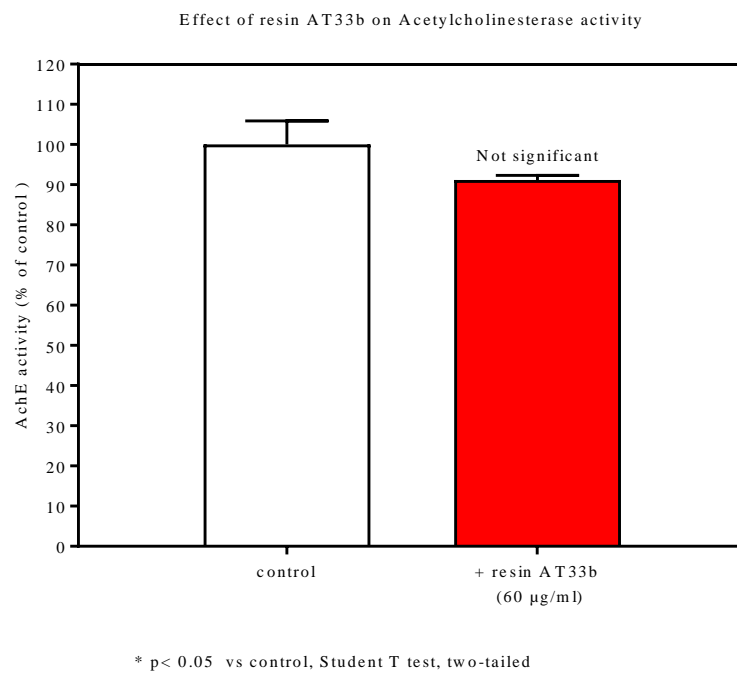


Fig. 63. Effet de l'extrait AT33B sur l'activité de l'Acétylcholinestérase. Les données exprimées en pourcentage de contrôle montrent la moyenne \pm SEM (100% = pas de composé). Test T Fisher, * p < 0,05.

L'extrait AT33B n'a eu aucun effet significatif sur l'activité de l'acétylcholinestérase, comme l'a déterminé le KIT du dosage AChE (Fig. 63).

➤ Coloration des neurones et des neurites

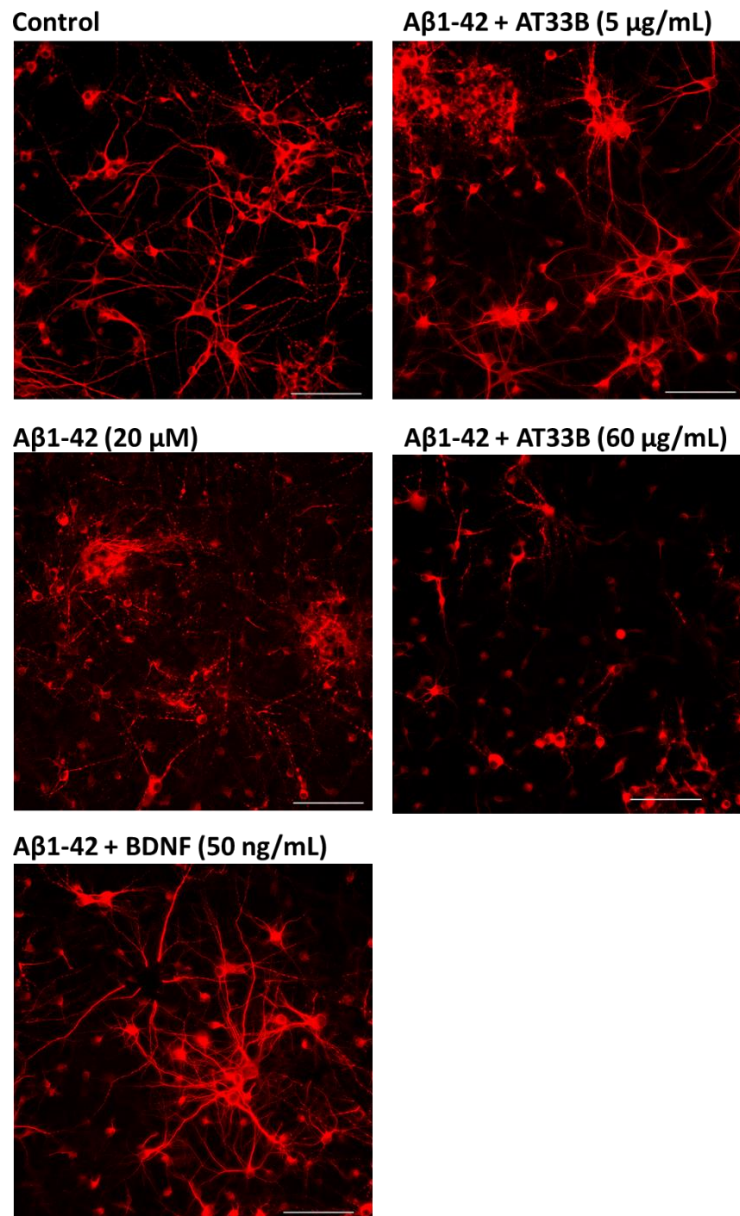


Fig. 64. Coloration des neurones et du réseau des neurites après traitement par l'extrait AT33B.

La coloration des neurones montre la mort des cellules après intoxication par le peptide A β (20 μ M). Le traitement de l'extrait AT33B protège les neurones et améliore leur survie ainsi que la reconstitution de réseau des neurites à une dose de 5 μ g/mL (Fig. 64).

6.7 Activité neuroprotectrice de l'extrait AT33B in vivo

Le but de l'étude est de déterminer si l'application de la nouvelle formulation de l'extrait (AT33B) et d'un mélange d'AT33B et de Bacopa peut améliorer la pathologie induite chez la souris suite à une injection intracérébroventriculaire (ICV), d'oligomère de peptide amyloïde ($A\beta_{25-35}$) par rapport au peptide de contrôle brouillé (Sc.A β). Le Bacopa est ajouté à l'extrait puisqu'il possède l'allégation du maintien des fonctions de la mémoire (Annexe 2).

Cette étude est divisée en deux parties. La première partie est nécessaire pour définir les doses actives des deux composés (AT33B et Bacopa). La deuxième partie de l'étude teste l'efficacité des deux composés co-administrés à leurs doses efficaces pour évaluer s'il existe un effet synergique. L'efficacité de l'extrait AT33B et du Bacopa administrés quotidiennement est évaluée 7 jours après l'injection du peptide sur l'amélioration des déficits d'apprentissage induits par $A\beta_{25-35}$:

- Mémoire de travail spatiale par alternance spontanée dans le labyrinthe en Y (*Y-maze*)
- Mémoire contextuelle à long terme par test d'évitement passif « *Step-Through Passive Avoidance* » (STPA)

L'extrait AT33B, le Bacopa et le véhicule sont administrés quotidiennement *per os* (PO) deux fois par jour (b.i.d.). L'administration débute 14 jours (J) avant l'injection du peptide $A\beta_{25-35}$ et dure jusqu'à J-10 après l'injection du peptide $A\beta_{25-35}$, au cours de laquelle les animaux sont examinés comportementalement.

L'extrait AT33B et le Bacopa sont incorporés dans des croquettes adaptées aux souris produites par la société SAFE (Fig. 65).



Fig. 65. Croquettes chargées en actifs (extrait AT33B et Bacopa).

6.7.1 Protocole de l'étude

- Soixante-quatre (64) souris suisses (30 à 35 g) sont utilisées dans la première phase.
- 8 groupes d'animaux sont constitués de la manière suivante :

Tableau 23. Phase 1 de l'étude in vivo en utilisant les croquettes.

Traitements de groupe : phase 1	n
1. Sc.A β + véhicule	8
2. A β_{25-35} + véhicule	8
3. A β_{25-35} + AT33B 62,5 mg/kg PO b.i.d.	8
4. A β_{25-35} + AT33B 125 mg/kg PO b.i.d.	8
5. A β_{25-35} + AT33B 250 mg/kg PO b.i.d.	8
6. A β_{25-35} + Bacopa 62,5 mg/kg PO b.i.d.	8
7. A β_{25-35} + Bacopa 125 mg/kg PO b.i.d.	8
8. A β_{25-35} + Bacopa 250 mg/kg PO b.i.d.	8
Total	64

Dans la première phase : de J-14 à J-10, des doses uniques de croquettes d'AT33B (groupes 3, 4 et 5) et de Bacopa (groupes 6, 7 et 8) sont administrées PO b.i.d.

- Au J-1, 1h après l'administration des composés, le peptide Sc.A β ou les oligomères du peptide A β_{25-35} sont injectés par ICV.
- Aux jours compris entre J-8 et J-10, deux tests de comportement différents sont réalisés :
- La procédure d'alternance spontanée dans le labyrinthe en Y (évaluation de la mémoire de travail spatiale) à J-8 (7 jours après l'injection de peptide)
- La réponse d'évitement passif (évaluation de la mémoire contextuelle à long terme) avec entraînement à J-9 et séance de rétention à J-10
- Au J-10, après le dernier test de comportement, les animaux sont euthanasiés.
- De tous les animaux par groupe, le cerveau est retiré, l'hippocampe et le cortex frontal sont disséqués.

6.7.2 Résultat du test de l'alternance spontanée dans le labyrinthe en Y

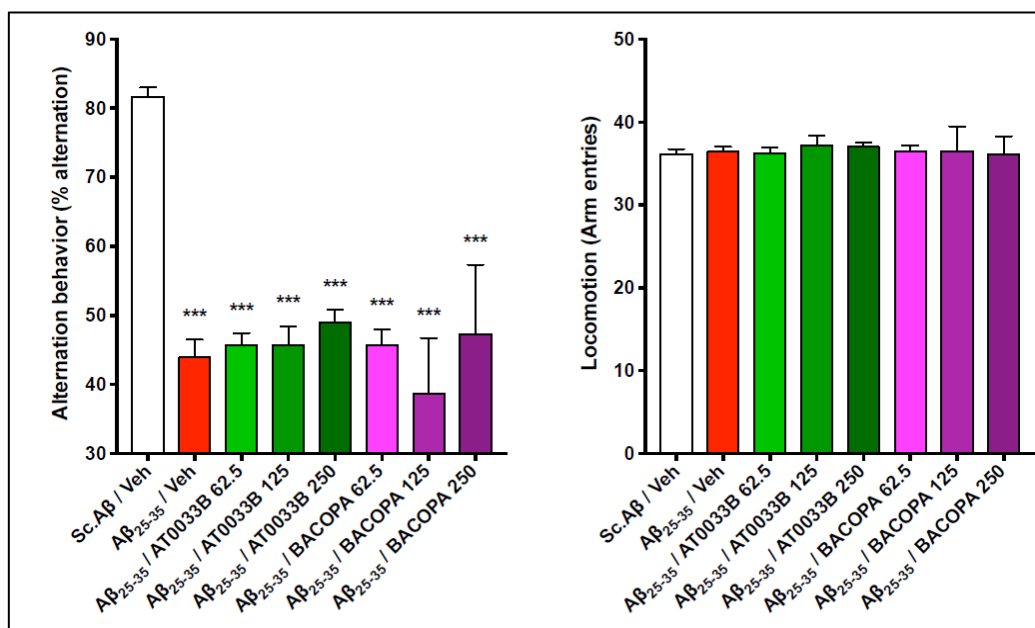


Fig. 66. Effets de l'extrait AT33B et du Bacopa administrés p.o. pendant 23 jours sur des déficits d'alternance spontanée induits par Aβ₂₅₋₃₅ chez la souris. V, solution de véhicule. *** p <0,001, * p <0,05 par rapport au groupe Sc.Aβ; ### p <0,001 par rapport au groupe traité avec Aβ₂₅₋₃₅; test de Dunnett.

6.7.3 Résultat du test d'évitement passif « Step-Through Passive Avoidance »

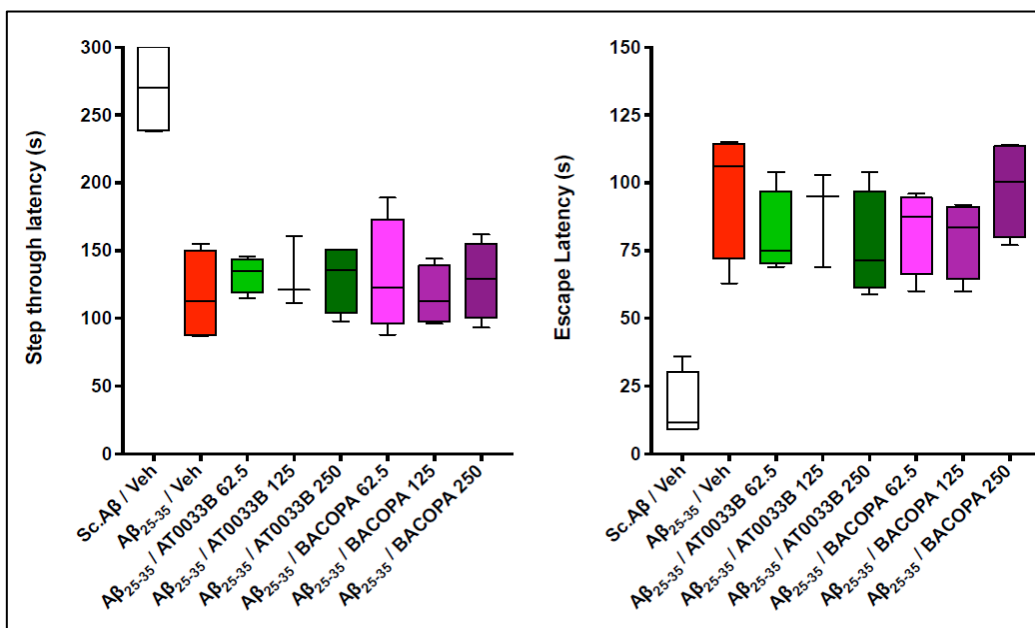


Fig. 67. Effets de l'extrait AT33B et du Bacopa administrés p.o. pendant 23 jours sur les déficits d'évitement passif induits par Aβ₂₅₋₃₅ chez la souris. V, solution de véhicule. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 par rapport au groupe Sc.Aβ; ## p <0,01, ### p <0,001 par rapport au groupe traité par Aβ₂₅₋₃₅; test de Dunnett.

Les résultats de cette expérience montrent aucun effet significatif. Le traitement par AT33B et le Bacopa pendant 24 jours n'a pas atténué les déficits induits par Aβ₂₅₋₃₅ (Fig. 66 et Fig. 67).

Nous n'avons pas pu déterminer une concentration efficace et donc nous n'avons pas pu accéder à l'étape 2 de cette expérience qui consistait en une administration d'un mélange AT33B/Bacopa.

Les résultats *in vitro* de l'extrait AT33B ont montré une efficacité à améliorer la survie neuronale, le réseau des neurites ainsi que l'inhibition de la production de ROS. Nous devons avoir des résultats significatifs *in vivo*. Une hypothèse fiable pour comprendre les résultats insatisfaisants obtenus est basée sur la forme galénique dans laquelle l'extrait a été véhiculé. L'extrait AT33B et le Bacopa ont été incorporés dans des croquettes spécifiques pour les souris. Ces croquettes appréciées par les souris, permettent de réduire le stress induit par le gavage traditionnel. Les croquettes présentent l'avantage de l'absence de solvants organiques. Le même test *in vivo* de l'extrait AT000 (voir l'article chapitre 2, partie 1), dans lequel, le véhicule utilisé était une solution de DMSO 5%, a montré des résultats satisfaisants avec un blocage complet aux doses maximales testées des déficits induits par le peptide neurotoxique A β ₂₅₋₃₅. Nous pensons que le DMSO a joué le rôle de promoteur d'absorption.

Nous avons alors décidé de refaire le test dans les mêmes conditions mentionnés dans l'article (Iskandar et al., 2018). Pour cela, nous avons administré quotidiennement l'extrait AT33B et le Bacopa solubilisés dans du DMSO 5% *per os* (PO) deux fois par jour par gavage (b.i.d.). Le gavage est réalisé en utilisant une seringue jetable de 1 ml (réf. SS + 01T1, Terumo) avec une canule en acier inoxydable (réf. 075486, Dominique Dutscher). Les composés sont administrés dans un volume calculé en fonction du poids corporel de chaque souris (5 mL/kg). Deux doses d'AT33B et de Bacopa ont été testées (125 et 250 mg/kg/jour).

- Trente-quatre (34) souris suisses (30 à 35 g) sont utilisées.
- Six (6) groupes d'animaux sont constitués de la manière suivante :

Tableau 24. Phase 1 de l'étude *in vivo* selon le gavage traditionnel.

Traitements de groupe : phase 1	n
1. Sc.A β + véhicule	5
2. A β ₂₅₋₃₅ + véhicule	5
3. A β ₂₅₋₃₅ + AT33B 125 mg/kg PO b.i.d.	6
4. A β ₂₅₋₃₅ + AT33B 250 mg/kg PO b.i.d.	6
5. A β ₂₅₋₃₅ + Bacopa 125 mg/kg PO b.i.d.	6
6. A β ₂₅₋₃₅ + Bacopa 250 mg/kg PO b.i.d.	6
Total	34

6.7.4 Résultat du test de l'alternance spontanée dans le labyrinthe en Y

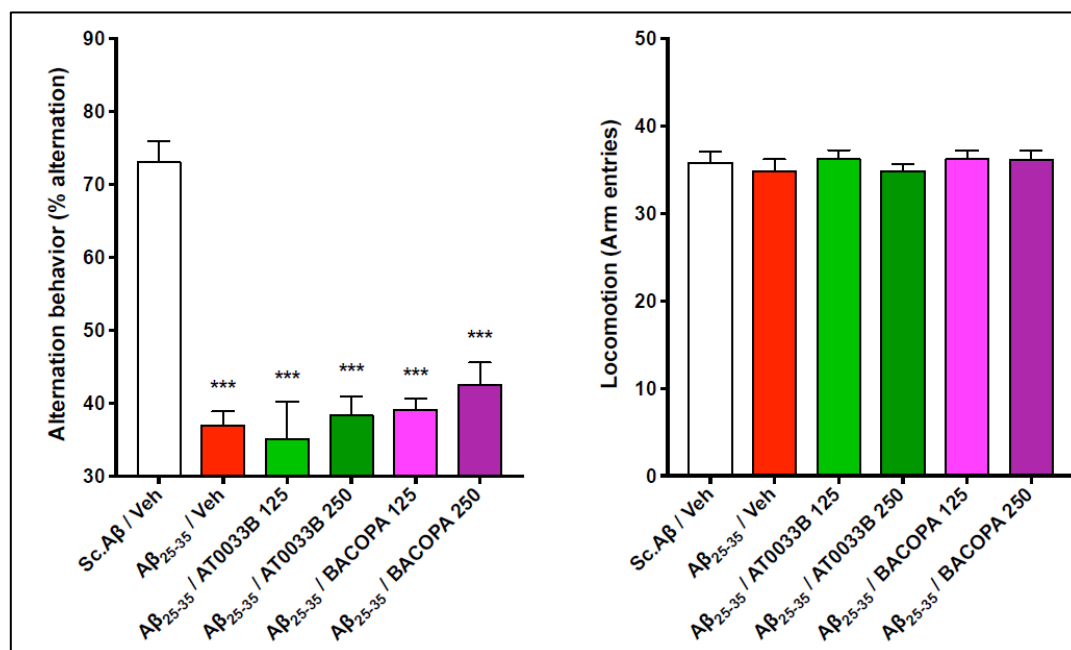


Fig. 68. Effets de l'extrait AT33B et du Bacopa administrés p.o. (DMSO 5%) sur des déficits d'alternance spontanée induits par Aβ₂₅₋₃₅ chez la souris. V, solution de véhicule. *** p <0,001, * p <0,05 par rapport au groupe Sc.Aβ; ### p <0,001 par rapport au groupe traité avec Aβ₂₅₋₃₅; test de Dunnett.

6.7.5 Résultat du test d'évitement passif « Step-Through Passive Avoidance »

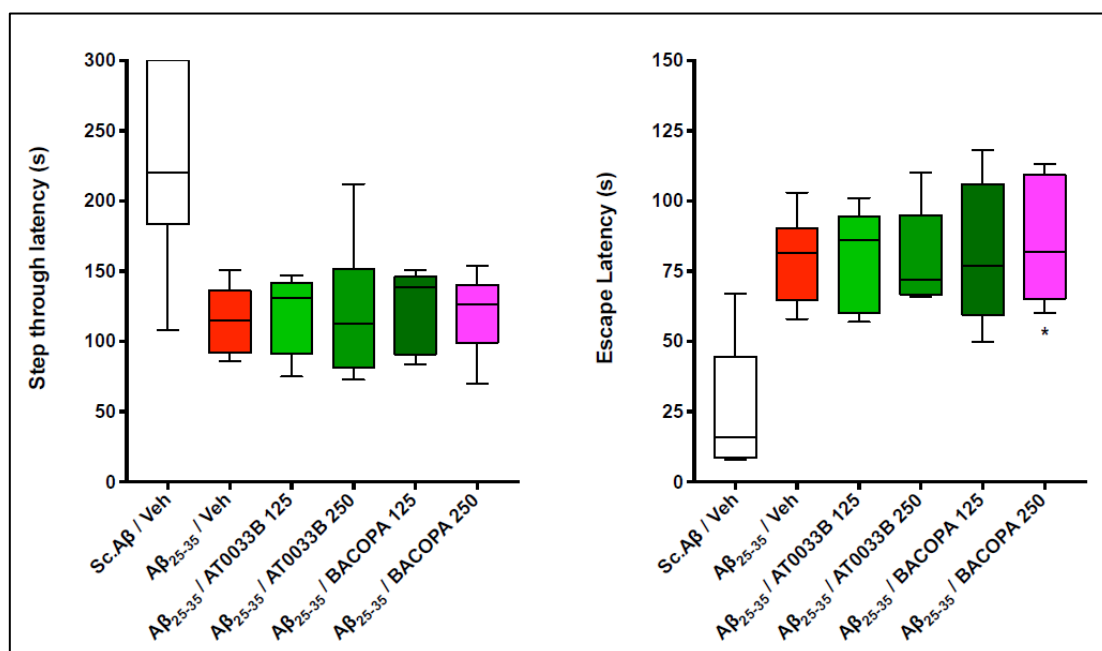


Fig. 69. Effets de l'extrait AT33B et du Bacopa administrés p.o. (DMSO 5%) sur les déficits d'évitement passif induits par Aβ₂₅₋₃₅ chez la souris. V, solution de véhicule. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 par rapport au groupe Sc.Aβ; ## p <0,01, ### p <0,001 par rapport au groupe traité par Aβ₂₅₋₃₅; test de Dunnett.

Les résultats obtenus, ne montrent aucune activité significative des extraits (AT33B et Bacopa) (Fig. 68-Fig. 69). A savoir que les tests réalisés évaluent le comportement des souris.

Des tests de biochimie (peroxydation lipidique et analyse de l'expression des gènes) doivent être réalisés pour déterminer la présence d'un changement affectant les gènes d'inflammation impliqués dans la maladie d'Alzheimer.

Pour expliquer les résultats obtenus, il faut étudier les paramètres modifiés par rapport à la première étude réalisé sur l'extrait AT000 publié dans l'article (chapitre 2, partie 1). Nous avons pensé que la solubilisation de l'extrait dans une solution de DMSO 5% a eu un effet de promoteur d'absorption en laissant pénétrer l'extrait à travers les barrières biologiques notamment la barrière hémato-encéphalique. Une deuxième hypothèse est émise, celle de la forme de l'extrait. En effet l'extrait AT000 évalué dans la première étude était sous forme de résine, tandis que l'extrait AT33B est sous forme de poudre. Nous supposons que le passage de la résine à la poudre nécessite un chauffage sous vide, qui a conduit probablement à une dégradation/évaporation des molécules volatiles fragiles.

6.8 Conclusion sur les activités biologiques de l'extrait AT33B

L'optimisation des quantités des plantes constituant l'extrait AT00X, nous a permis d'obtenir une nouvelle formule brevetable AT33B tout en améliorant les pouvoirs antioxydant et anti-inflammatoire.

Les résultats des tests d'évaluation des activités biologiques de l'extrait AT33B, montrent une grande capacité à retarder, voire à arrêter une chaîne de réactions oxydatives selon le test ORAC (qui évalue l'activité antioxydante de manière dynamique avec des radicaux actifs sur le plan pathologique), et un fort pouvoir antiradicalaire selon le test DPPH dans le but de prévenir la formation de dommages oxydatifs et de stabiliser les radicaux libres. Plusieurs tests doivent être réalisés afin de refléter la capacité antiradicalaire et antioxydante totale d'un échantillon. Dans ce but, nous avons eu recours au test KRL, technique biologique qui permet d'évaluer la capacité d'un produit à améliorer les défenses cellulaires préventivement à une agression radicalaire. L'extrait AT33B présente une forte activité antiradicalaire selon le test KRL. L'extrait AT33B présente également une forte activité anti-inflammatoire supérieure à celle de la dexaméthasone (contrôle positif), en inhibant la libération de NO à partir de macrophages murins stimulés par les LPS et en réduisant la cytotoxicité induite par le LPS.

L'étude de l'évaluation de l'activité neuroprotectrice in vitro a montré que l'extrait AT33B, à 5µg/mL, est capable de protéger les neurones corticaux après une intoxication par Aβ₁₋₄₂. De plus, à cette dose d'AT33B, la production de ROS était significativement réduite.

L'extrait AT33B possède un effet protecteur sur le réseau de neurites à une dose de 1 µg/mL. La dose la plus élevée d'AT33B a encore augmenté la toxicité due à Aβ₁₋₄₂, en termes de mort cellulaire neuronale et de production de ROS. De manière surprenante et malgré cette toxicité sévère, le réseau de neurites des neurones MAP-2 n'a pas été altéré à cette dose de AT33B. L'AT33B (60 µg/mL), pourrait avoir un effet sur l'élongation des neurites. Pour conclure sur cet aspect, un travail supplémentaire devrait être effectué.

In vivo, les résultats de l'évaluation de l'activité neuroprotectrice de l'extrait AT33B ne sont pas satisfaisants. Une étude approfondie doit être effectuée afin d'expliquer ces résultats.

Conclusion

- Extrait AT33X : version alimentaire optimisée selon des plans d'expériences
- Contrainte réglementaire : nouvelle version de l'extrait optimale AT33B
- Activités biologiques évaluées (AT33B) :
 - Activité antioxydante : DPPH = 874 µg/mL, ORAC = 391800 µmol TE/100g, KRL = 120,85%, ABTS = 823,67 µg/mL
 - Activité anti-inflammatoire : 414
 - Activité neuroprotectrice in vitro : dose efficace 1 µg/mL

7 PARTIE 4. ÉTUDE ANALYTIQUE

Étant donné que les extraits de plantes se présentent généralement sous la forme d'une combinaison de divers types de composés bioactifs ou de composés phytochimiques de polarités différentes, leur séparation reste un défi majeur pour le processus d'identification et de caractérisation des composés bioactifs. Dans l'isolement de ces composés, il est courant que diverses techniques de séparation, soient utilisées pour obtenir des composés purs. Dans notre étude, nous avons identifié la composition des extraits AT00X et AT33B à l'aide de la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la masse (GC-MS).

7.1 Identification chimique des extraits par HPLC

L'HPLC est une technique de chimie analytique utilisée pour séparer, identifier et quantifier chaque composant d'un mélange. Elle repose sur des pompes pour faire passer un solvant liquide (phase mobile) sous pression contenant l'échantillon dans une colonne réverse remplie de silice modifiée pour la rendre apolaire (phase stationnaire). Chaque composant de l'échantillon, selon sa polarité, interagit de manière différente avec la silice, Cela signifie que ce sont désormais les molécules polaires qui traverseront la colonne plus rapidement, et les molécules apolaires vont être retenues plus longtemps dans la colonne (Fig. 70).

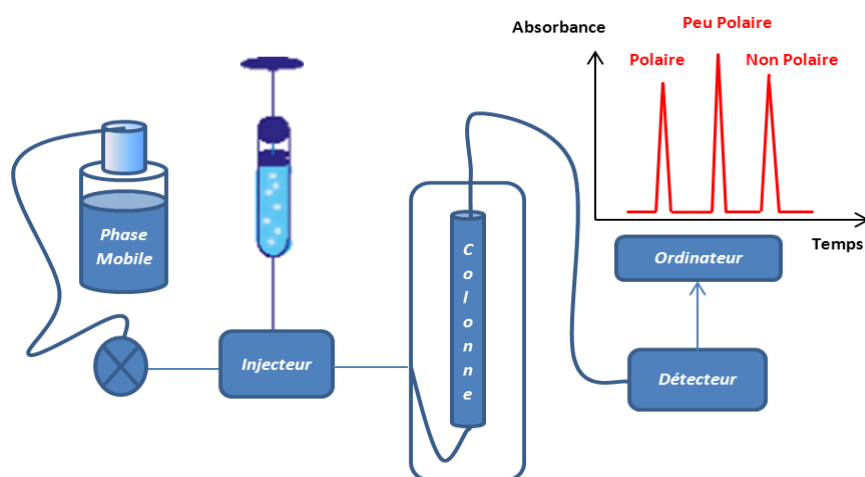


Fig. 70. Schéma du principe de l'HPLC.

7.1.1 Méthode d'analyse par HPLC

Appareillage

- Instrument WATERS comprenant une pompe binaire 1525, une vanne RHEODYNE 7725i, un four, un détecteur à barrette de diodes DAD 2996
- Pilotage par le logiciel EMPOWER (v2002)

Solvants et réactifs

- Acétonitrile et acide acétique de chez Sigma-Aldrich, grade HPLC
- Eau ultrapure (18.2 MΩ/cm), obtenue par le système de purification Purelab-Classic (Elga)

Conditions chromatographiques

- Phase stationnaire : Colonne CORTECS C₁₈ (75 x 4.6 mm, porosité 2.7 μm, de chez WATERS) plus cartouche de garde
- Phase mobile : Gradient A, H₂O (0,1% AcOH) vers B, ACN (pur), de 5% vers 80% de B, temps du gradient 30 min, retour à 5% B en 5 min (total 35 min).
- Débit : 0,8 mL/min, température du four 30°C

7.1.2 Protocole

10 mg de l'extrait végétal en poudre sont pesés et dissous dans 1 mL de MeOH. Après agitation au vortex et solubilisation aux ultrasons, la solution est filtrée et 5 μL sont injectés dans la boucle d'injection.

7.1.3 Résultats

➤ Extrait AT00X

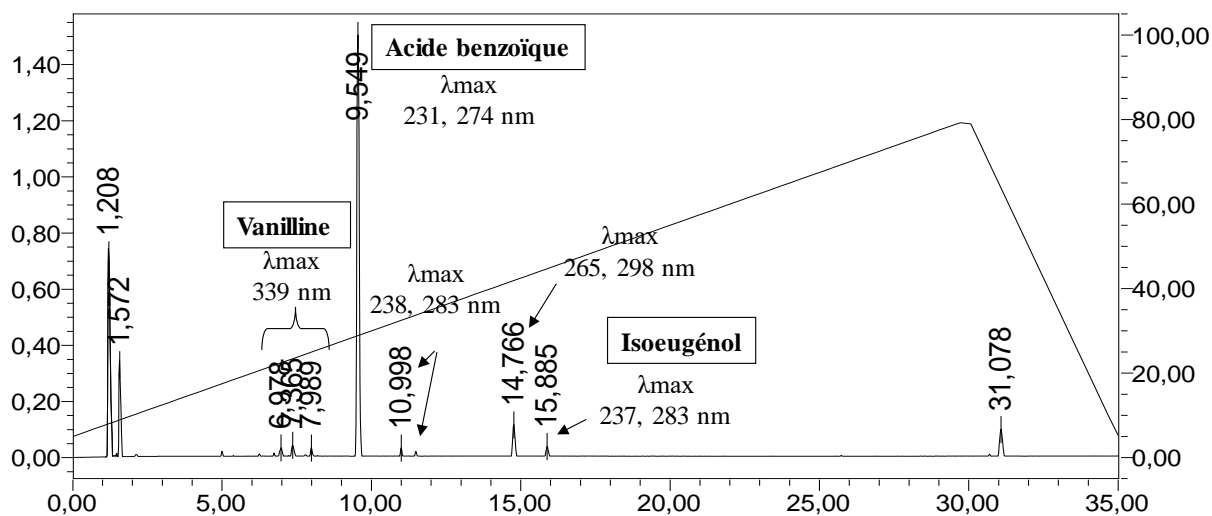


Fig. 71. Chromatogramme de l'élution par HPLC de l'extrait AT00X.

➤ Extrait AT33B

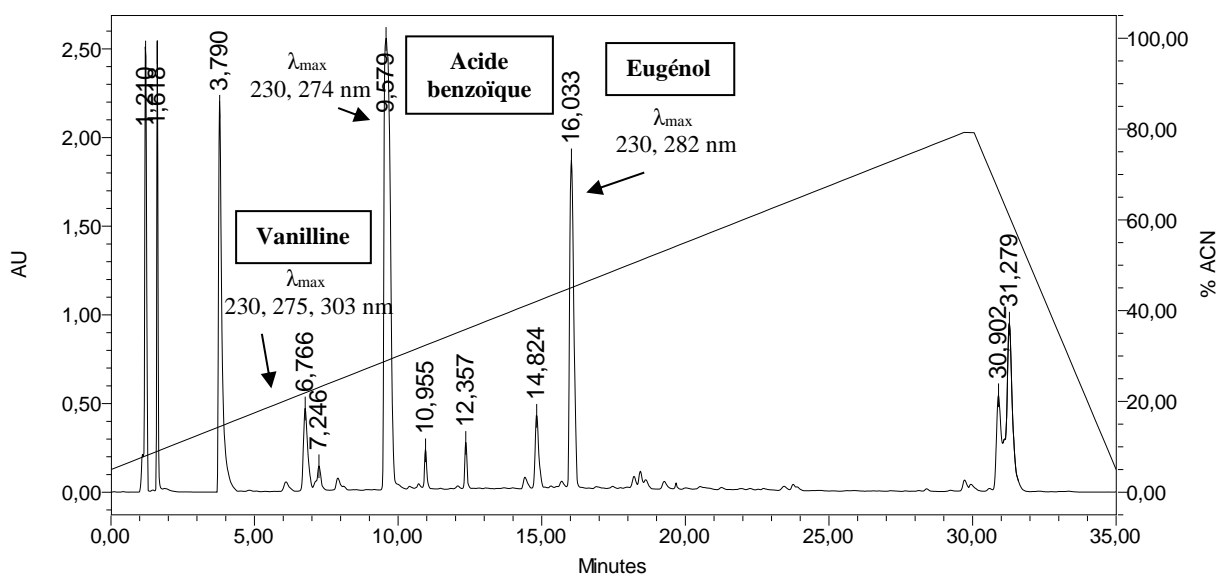


Fig. 72. Chromatogramme de l'élution par HPLC de l'extrait AT33B.

Les molécules majoritaires identifiées des chromatogrammes HPLC des extraits AT00X et AT33B (Fig. 71-Fig. 72) sont :

- La Vanilline : tr 6,6766 min, λ_{\max} [230, 275, 303 nm]
- L'Acide benzoïque : tr 9,579 min, λ_{\max} [230, 274 nm]
- L'Eugénol : tr 16,033 min, λ_{\max} [230, 282 nm]

En comparant les 2 chromatogrammes, nous avons le même profil analytique. L'intensité des pics du chromatogramme HPLC de l'extrait AT33B est supérieure à celle de l'extrait AT00X à cause de l'augmentation des quantités des plantes à la suite de l'optimisation, surtout l'*Eugenia caryophyllata* qui contient de l'eugénol et l'isoeugénol en quantité majoritaire.

7.2 Identification par GC-MS

La chromatographie gaz-liquide (souvent appelée simplement chromatographie en phase gazeuse) est un puissant outil d'analyse. En chromatographie gaz-liquide, la phase mobile est un gaz tel que l'hélium et la phase stationnaire est un liquide à haut point d'ébullition adsorbé sur un solide. Une très petite quantité de l'échantillon est injectée dans la machine à l'aide d'une petite seringue. L'aiguille de la seringue passe à travers un disque en caoutchouc épais (appelé septum) qui se referme de nouveau lorsque la seringue est retirée. L'injecteur est contenu dans un four dont la température peut être contrôlée. Il est suffisamment chaud pour que tout l'échantillon bout et soit transporté dans la colonne sous forme de gaz par l'hélium (ou un autre gaz porteur).

La colonne est généralement en acier inoxydable. Elle est remplie de terre de diatomées finement broyée, et recouverte d'un liquide à haut point d'ébullition - typiquement un polymère cireux. La température de la colonne peut varier d'environ 50 °C à 250 °C. Elle est plus froide que le four à injecteur, de sorte que certains composants du mélange peuvent se condenser au début de la colonne (Fig. 73).

Le temps pris par un composé particulier pour traverser la colonne jusqu'au détecteur est appelé son temps de rétention. Ce temps est mesuré à partir du moment où l'échantillon est injecté jusqu'au point où l'écran affiche une hauteur maximale pour ce composé.

Pour un composé particulier, le temps de rétention variera en fonction du :

- Point d'ébullition du composé. Un composé qui bout à une température supérieure à la température de la colonne va passer presque tout son temps à se condenser sous forme liquide au début de la colonne. Un point d'ébullition élevé signifie donc un long temps de rétention.
- La solubilité dans la phase liquide. Plus un composé est soluble dans la phase liquide, moins il passera de temps à être entraîné par le gaz. Une solubilité élevée dans la phase liquide signifie un temps de rétention élevé.

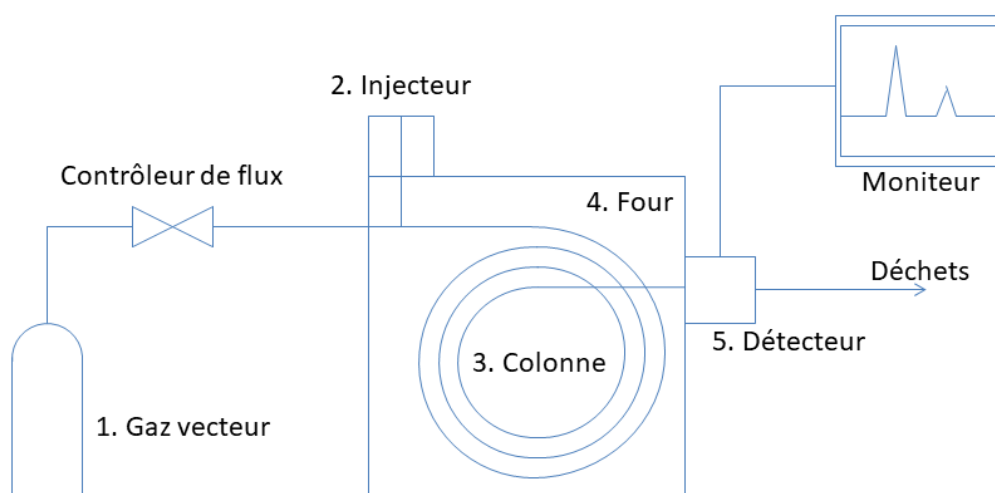


Fig. 73. Schéma du principe de la chromatographie gazeuse (GC-MS).

7.2.1 Protocole

10 mg de l'extrait en poudre sont pesés et ajoutés à 1 mL de MeOH. Après agitation au vortex et solubilisation aux ultrasons, la solution est filtrée. 100 μ L de la solution filtrée sont prélevés et séchés à l'azote, ensuite 100 μ L de BSTFA sont ajoutés et le tout est incubé à 70°C pendant 20 min. 2 μ L sont injectés pour l'analyse en GC-MS.

L'analyse est effectuée à partir d'extraits secs. Les composés sont préalablement dérivés pour les rendre volatils. La dérivation s'effectue dans un tube de type CHROMACOL de 2 mL scellé par un bouchon et un septum hermétique. 100 μ L de BSTFA (N,O-bis (triméthylsilyl) trifluoroacétamide, SIGMA-ALDRICH M7891) sont directement ajoutés à environ 0,1 mg d'échantillon sec. Au besoin, 10-50 μ L de pyridine sont rajoutés dans le cas où le résidu aurait du mal à se dissoudre. La solution est incubée 20 min à une température de 70 °C, et 2 μ L sont directement injectés en GC-MS. Les analyses sont menées avec un appareil GC-MS (Shimadzu GC-MS 2010) composé d'un détecteur spectromètre de masse QP 2010S équipé d'une source d'ion à impact électronique et d'un analyseur de type quadrupôle, d'un logiciel d'acquisition GC/MS Solution ainsi que des banques (NIST, WILEY). Les composés sont séparés à l'aide d'une colonne capillaire DB-1 (30 m x 0,32 mm x 0,25 μ m, de chez JW Scientific) et dont les limites de température sont comprises entre -60 °C et 350 °C. La phase mobile est l'hélium. La pression dans la colonne est de 3 psi et le débit de 1,59 mL/min. La température de l'injecteur (Inlet) est de 280 °C, le mode d'injection est le splitless et l'auxiliaire (ligne de transfert) à 280 °C, la source à 150 °C. le mode de détection est le full

scan. La programmation du gradient de température est la suivante : 1 min à 60 °C, puis croissant de 100 à 260 °C à raison de 4 °C/min, puis 10 min à 260 °C. La durée totale de l'élution est de 62 min.

7.2.2 Résultats

La chromatographie gazeuse couplée à la masse (GC-MS), permet l'identification de la majorité des composés dont la masse ne dépassant pas les 500 daltons. Les pics numérotés dans le chromatogramme (Fig. 74-75), représentent les molécules identifiées dans les extraits AT00X et AT33B respectivement, et classées dans un tableau avec leur pourcentage correspondant basé sur la surface du pic (Tableau 25-26).

➤ *Extrait AT00X*

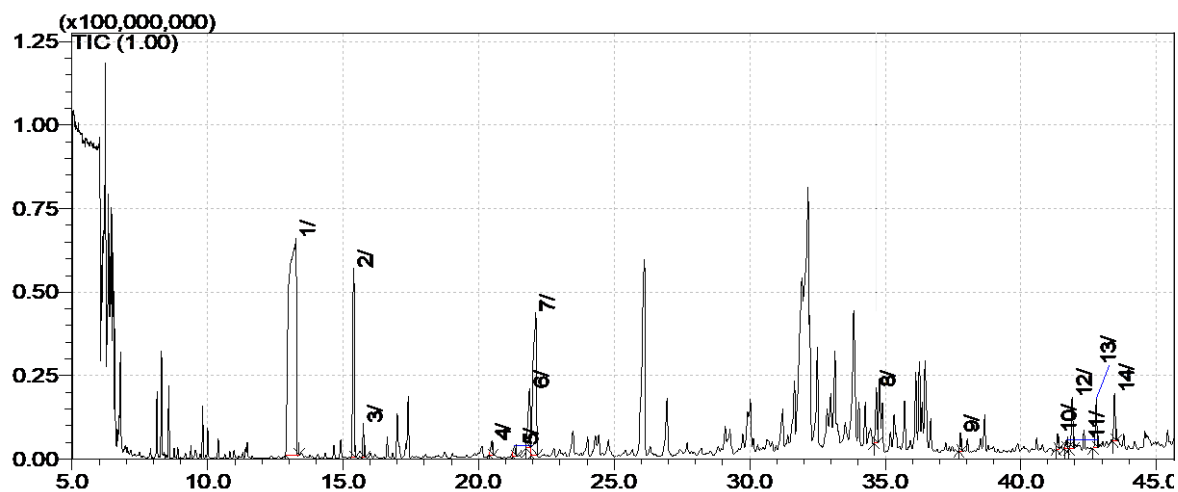


Fig. 74. Chromatogramme de l'analyse par GC-MS de l'extrait AT00X.

Tableau 25. Molécules identifiées dans l'extrait AT00X.

Pic	Tr (min)	Aire	Aire (%)	Hauteur	Hauteur (%)	A/H	Nom
1	13,26	1236095508	14,85	65972247	5,22	18,74	Acide benzoïque
2	15,38	237109099	2,85	56976043	4,50	4,16	Glycérol
3	15,74	32378446	0,39	10613656	0,84	3,05	Acide succinique
4	20,48	35258021	0,42	5223204	0,41	6,75	Isoeugénol
5	21,31	18278385	0,22	3192901	0,25	5,72	Eugénol
6	21,87	146646016	1,76	20796908	1,64	7,05	Vanilline
7	22,10	365124050	4,39	43600543	3,45	8,37	Acide malique
8	34,67	105686849	1,27	20661671	1,63	5,12	Acide gallique
9	37,77	36847829	0,44	7124727	0,56	5,17	Nerolidol isobutyrate
10	41,36	34182718	0,41	6931009	0,55	4,93	Acide pimarique
11	41,67	34609927	0,42	4785831	0,38	7,23	Acide pimarique
12	41,89	87193468	1,05	17529470	1,39	4,97	Acide isopimarique
13	42,78	89747263	1,08	17168108	1,36	5,23	Acide déhydroabiétique
14	43,45	89334651	1,07	18893914	1,49	4,73	Acide abiétique

➤ *Extrait AT33B*

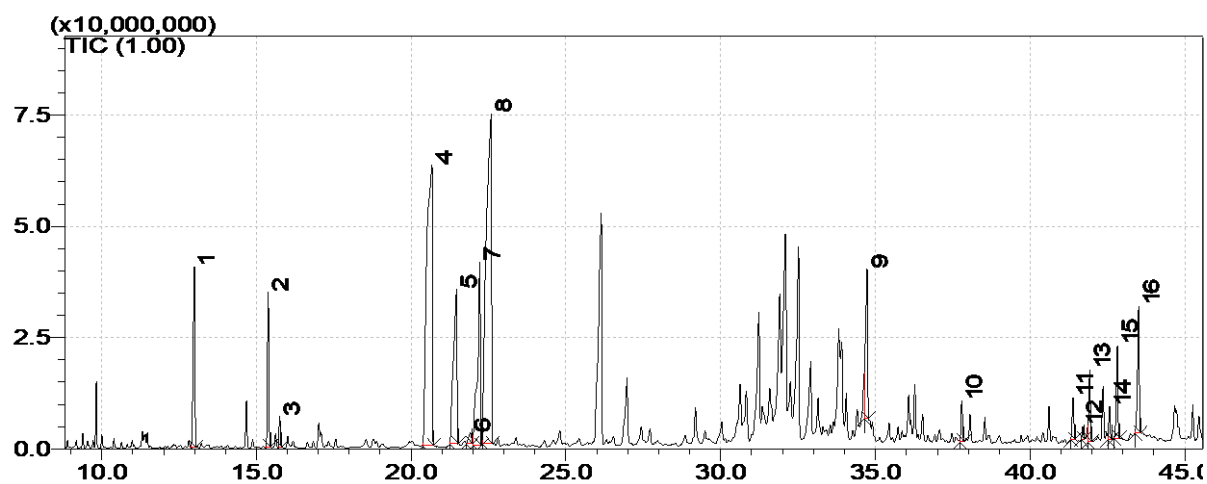


Fig. 75. Chromatogramme de l'analyse par GC-MS de l'extrait AT33B.

Tableau 26. Molécules identifiées dans l'extrait AT33B.

Pic	Tr (min)	Aire	Aire (%)	Hauteur	Hauteur (%)	A/H	Nom
1	12,99	156355782	2,86	40688759	5,48	3,84	Acide benzoïque
2	15,38	112838272	2,06	35138349	4,73	3,21	Glycérol
3	15,74	23197809	0,42	7230118	0,97	3,21	Acide succinique
4	20,67	797596497	14,58	63569959	8,56	12,55	Isoeugénol
5	21,46	284638711	5,20	35569226	4,79	8,00	Eugénol
6	21,91	27671074	0,51	3466567	0,47	7,98	Vanilline
7	22,21	267146744	4,88	41817104	5,63	6,39	Acide malique
8	22,58	902029566	16,52	75066394	10,11	12,02	Acide cinnamique
9	34,73	327893268	5,99	40031317	5,39	8,19	Acide gallique
10	37,79	44762270	0,82	10274609	1,38	4,36	Nerolidol isobutyrate
11	41,38	32321241	0,59	9426424	1,27	3,43	Acide pimarique
12	41,69	24258018	0,44	4569169	0,62	5,31	Acide pimarique
13	41,92	86154501	1,57	17259666	2,32	4,99	Acide isopimarique
14	42,56	38542826	0,70	9067072	1,22	4,25	Cinnamyl cinnamate
15	42,81	101686251	1,86	22742567	3,06	4,47	Acide déhydroabiétique
16	43,50	167891152	3,07	31547739	4,25	5,32	Acide abiétique

7.3 Discussion de la composition de l'extrait AT33B

Le chromatogramme de l'analyse par GC-MS de l'extrait AT33B, montre la composition riche de cet extrait en composés phénoliques et terpéniques.

7.3.1 Acides phénoliques

Les polyphénols sont présents dans de nombreux aliments tels que le raisin, la carotte, les épinards, le café, la tomate et l'ail (Alamed et al., 2009). Ils possèdent plusieurs actions biologiques telles que des activités antioxydantes, antiradicalaires, anti-inflammatoires et neuroprotectrices (Guven et al., 2015; Yoon et al., 2014).

Les acides phénoliques tels que l'acide benzoïque et l'acide gallique, inhibent la neurodégénérescence de l'hippocampe grâce à leurs puissantes propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques (Latha and Daisy, 2011; Mansouri et al., 2013). Ils luttent contre la neurotoxicité induite par le peptide A β ₂₅₋₃₅ dans les cellules PC12 par le biais d'activités antioxydantes et anti-apoptotiques (Hong et al., 2012). Ils contribuent également à la diminution des niveaux de la peroxydation lipidique (LPO), de NO et des ROS, marqueurs du stress oxydatif, principal acteur de nombreuses maladies neurodégénératives (Dugan et al., 1995; Oyagbemi et al., 2016).

Les propriétés antioxydantes des acides phénoliques peuvent être attribuées à une activité de piégeage directe des radicaux libres, à l'inactivation des enzymes responsables de la production de ROS et/ou à la régulation à la hausse des enzymes antioxydantes (Saibabu et al., 2015; Thyagaraju and Muralidhara, 2008).

7.3.2 Vanilline

La vanilline, un composé phénolique, offre une neuroprotection en raison de ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques. La vanilline neutralise l'apoptose en préservant les fonctions mitochondriales et l'action antioxydante (Dhanalakshmi et al., 2015). Une étude menée par Kim and Park 2017, a montré que le traitement à la vanilline a considérablement atténué les troubles d'apprentissage et de la mémoire induits par la Scopolamine.

7.3.3 Eugéno

Selon des rapports récents, l'eugéno atténue la neurotoxicité induite par les peptides bêta-amyloïdes in vitro. Il inhibe l'afflux excessif d'ions calcium induit par l'A β dans les neurones, responsable de la mort neuronale.

L'eugéno a des effets neuroprotecteurs contre divers types d'événements inflammatoires. La cyclooxygénase inductible (COX-2) est un facteur important dans la conduite des processus inflammatoires dans de nombreux organes, y compris le cerveau (Marnett and Kalgutkar, 1999). Le blocage de cette enzyme peut réduire l'inflammation.

L'eugéno exerce une activité inhibitrice dépendante de la dose sur la production de PGE2 en supprimant l'expression génique de COX-2, dans des macrophages stimulés par des lipopolysaccharides (LPS) (Kim et al., 2003). Il inhibe également l'activité enzymatique de la COX-2 (Huss et al., 2002).

L'eugéno a une activité antioxydante. Il peut éliminer directement les radicaux libres et réduire le stress oxydatif ainsi que la production de ROS (Ogata et al., 2000; Taira et al., 1992). L'isoeugéno, isomère de l'eugéno, inhibe la peroxydation des lipides induite par les ions ferriques et l'hydroperoxyde de cumène dans les homogénats de cerveau de rat (Rajakumar and Rao, 1993).

7.3.4 Acide cinnamique

L'acide cinnamique est un composé naturel qui possède diverses propriétés pharmacologiques pour divers troubles neurologiques. Il prévient l'agrégation de fibrilles d'A β , inhibe la toxicité médiée par l'A β , piège les ROS et réduit les effets inflammatoires in vitro et in vivo (Lan et al., 2017).

7.3.5 Acide gallique

L'acide gallique réduit les dommages neuronaux, la neuropathologie amyloïde cérébrale et améliore la fonction cognitive, via le piégeage des radicaux libres et l'inhibition de l'oligomérisation du peptide A β . Il joue un rôle neuroprotecteur en impliquant les voies antioxydantes et inflammatoires dans les modèles animaux de maladies neurodégénératives (Farbood et al., 2013; Korani et al., 2014; Mansouri et al., 2013; Naghizadeh and Mansouri, 2015). Cet effet protecteur potentiel contre la neurotoxicité est dû à la sensibilité des récepteurs NMDA et à l'excitotoxicité induite par le glutamate après une ischémie cérébrale, suivie d'un afflux de Ca⁺² et donc d'une accumulation intracellulaire de Ca⁺² induite par l'apoptose neuronale. D'autre part, l'acide gallique, grâce à son effet antioxydant peut s'opposer à l'activation des récepteurs NMDA et avoir ainsi un effet protecteur sur la neurotoxicité et/ou l'excitotoxicité après une lésion cérébrale (Korani et al., 2014). L'acide gallique se lie aux protéines et aux minéraux clés tels que le fer, le zinc et le calcium et affecte leur biodisponibilité en formant des complexes insolubles (Niho et al., 2001). Il améliore les déficits électrophysiologiques cérébraux grâce à des modifications des niveaux de cytokines pro et anti-inflammatoires, à des effets antioxydants dans les tissus cérébraux et à l'amélioration de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (Farbood et al., 2013; Mansouri et al., 2013).

L'acide gallique a également été décrit comme un excellent piègeur de radicaux libres qui permet la diminution du niveau de ROS dans le cerveau (Yang et al., 2006). Ceci indique que l'acide gallique exerce une activité antioxydante en modulant les dysfonctionnements du cerveau (Sun et al., 2014).

Le peptide A β perturbe la plasticité synaptique dans l'hippocampe en raison de la constitution des plaques séniles et de l'apoptose neuronale. Le traitement à l'acide gallique améliore l'échec synaptique et les dommages histologiques du cerveau induits par le peptide A β , et peut être introduit en tant qu'agent pharmacologique multipotent prometteur dans la prévention ou le traitement de la MA à l'avenir (Hajipour et al., 2016).

Ces résultats, cohérents avec d'autres recherches, ont montré l'effet thérapeutique potentiel d'antioxydants pour protéger les neurones contre la mort cellulaire induite par l'A β et la peroxydation des lipides. Il a été démontré que les antioxydants améliorent la fonction cognitive chez les rats âgés et empêchent les déficits d'apprentissage et de la mémoire après une lésion cérébrale (Farbood et al., 2013; Mansouri et al., 2014). Des études cliniques ont également décrit les effets positifs des traitements aux antioxydants pour ralentir la progression de la MA (McDaid et al., 2005; Scuderi et al., 2014).

7.3.6 Acide isopimarique

Les canaux BK (Big Potassium) sont des canaux potassiques voltage-dépendants qui conduisent de grandes quantités d'ions potassium (K⁺) à travers la membrane cellulaire. Ils aident à réguler les processus physiologiques, tels que l'excitabilité neuronale, le déclenchement des neurones et la libération des neurotransmetteurs. Ils jouent également un rôle dans la modulation de l'activité des dendrites ainsi que des astrocytes et des microglies (Contet et al., 2016). L'inhibition des canaux BK par le peptide A β ₁₋₄₂, empêche l'efflux de potassium et réduirait donc l'utilisation de l'ATP, permettant ainsi la survie neuronale dans des environnements pauvres en oxygène (Hermann et al., 2015). Les canaux BK peuvent également servir de protecteur neuronal en limitant l'entrée de calcium dans les cellules par oxydation de la méthionine. L'acide isopimarique bloque l'effet de A β ₁₋₄₂ dans les neurones de souris sauvages, en jouant le rôle d'activateur des canaux BK. Il constitue un candidat potentiel pour traiter la maladie d'Alzheimer (Yamamoto et al., 2011). La composition riche de l'extrait AT33B lui confère ses propriétés biologiques évaluées dans ce chapitre.

Conclusion

Les propriétés de l'extrait AT33B sont dues à sa richesse en composés phénoliques grâce à l'optimisation qui a permis d'augmenter la quantité des molécules bioactives.

CHAPITRE 3. GALÉNIQUE

Le troisième chapitre, étudie une stratégie galénique innovante, les nanoparticules lipidiques solides. Cette galénique est adaptée à notre extrait grâce à une étude d'optimisation basée sur des plans d'expériences qui consiste à modifier la quantité des trois ingrédients importants : le corps gras, le tensioactif et le Co-tensioactif. Cette optimisation vise à améliorer la taille, le potentiel zêta ainsi que la stabilité des nanoparticules. Une étude de caractérisation des nanoparticules est nécessaire pour valider le modèle de cette optimisation.

L'administration ciblée des médicaments pour la MA au système nerveux central (SNC) présente plusieurs limitations, notamment une faible solubilité, une pharmacocinétique médiocre, une faible biodisponibilité et une efficacité réduite en raison des obstacles de la barrière hémato-encéphalique. Bien que ces médicaments candidats aient réussi dans les études précliniques, ils n'ont pas démontré l'efficacité escomptée dans les essais sur l'homme (Becker et al., 2008; Mullard, 2017; Sharma and Singh, 2011).

Les progrès actuels en nanotechnologie offrent des opportunités pour surmonter ces limitations, en facilitant la pénétration de molécules de médicament dans le système nerveux central et en améliorant leur biodisponibilité (Parveen and Sahoo, 2006).

Récemment, une large gamme de nano-transporteurs, tels que des polymères, des émulsions, des lipo-porteurs, des lipides solides, des nanotubes de carbone, des supports à base de métal, etc., ont été adaptés pour développer des traitements efficaces avec libération prolongée et efficacité améliorée.

La libération prolongée de systèmes d'administration de nano-médicaments améliore le profil de libération contrôlée des médicaments chargés, minimisant ainsi le schéma posologique (Kumari et al., 2010). Ainsi, l'efficacité globale des médicaments candidats peut être améliorée en adaptant les systèmes d'administration de nano médicaments aux thérapies de la MA.

Parmi les différents systèmes nanoparticulaires existants, les nanoparticules lipidiques solides (SLN) présentent de nombreux avantages et des inconvénients limités. Dans ce chapitre, nous allons étudier et optimiser la stratégie galénique adoptée pour assurer un meilleur véhicule de l'extrait vers le cerveau, en employant les SLN.

7.4 Matériels et méthodes

Trois ingrédients sont principalement utilisés dans la préparation de nanoparticules lipidiques solides : les lipides, le surfactant et l'eau.

7.4.1 *Les lipides*

Les lipides constituant la matrice des SLN, sont biocompatibles, biodégradables et solides à température ambiante (Huo and Zhou, 2007). Les lipides naturels ou synthétiques utilisés doivent répondre aux principaux critères de sélection : une solubilité de l'actif dans les lipides fondus et un point de fusion suffisamment élevé, généralement supérieur à 40°C.

Parmi les principaux corps gras utilisés dans les SLN on peut citer le Glyceryl monostéarate (point de fusion 78-81°C), le Glyceryl béhénate (point de fusion 83°C), l'Acide stéarique (point de fusion 67-72°C), l'alcool Cétylique (point de fusion 49°C), la Cire de carnauba (point de fusion 82°C).

Le Compritol® 888 ATO (Gattefossé GmbH), l'excipient lipidique le plus préféré pour les SLN, est un corps gras composé de mono-, di- et triglycérides d'acide béhénique (C22), la fraction diester étant prédominante (40-60%). Ayant un point de fusion élevé (environ 70°C) et un équilibre hydrophile-lipophile (HLB) d'environ 2, le Compritol est utilisé comme agent lubrifiant dans les comprimés, et comme support lipidique pour les nanoparticules. Il sert également de matrice lipophile dans des formulations à libération prolongée (Patel et al., 2009). Le Compritol a été choisi en raison de ses caractéristiques chimiques qui confèrent une faible variation de potentiel polymorphique (Barthelemy et al., 1999).

7.4.2 *Le tensioactif*

Un tensioactif (TA) est un composé qui modifie la tension interfaciale entre deux surfaces. Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles composées d'une partie lipophile (affinité pour les lipides) et une partie hydrophile (affinité pour l'eau). Cette propriété leur permet également de solubiliser deux phases non miscibles. Les tensioactifs sont nécessaires pour stabiliser la dispersion du SLN et empêcher l'agrégation. Les émulsifiants sont caractérisés par la balance hydrophile/lipophile (HLB).

La HLB est une échelle allant de 0 à 20 utilisée pour mesurer le degré d'hydrophilie ou de lipophilie des tensioactifs. Une valeur HLB comprise entre 0 et 8 correspond à un tensioactif lipophile qui permet de stabiliser des émulsions inverses (type eau dans l'huile E/H). Pour une

HLB > 12, le tensioactif possède un caractère hydrophile et permet de stabiliser des émulsions directes (huile dans l'eau, H/E) (Griffin, 1946).

Le Tween 80 (polysorbate 80), est un tensioactif non ionique hydrophile (HLB 15), sous forme d'un liquide jaune et visqueux. Il est souvent utilisé comme émulsifiant pour stabiliser des préparations semi-solides ou liquides (crèmes, pommades, lotions, vaccins antigrippaux, suspensions orales et parentérales). Il est composé d'esters d'acide oléique et de polyoxyéthylène sorbitane. Les vecteurs lipidiques nanostructurés avec du tween 80 peuvent traverser efficacement la BHE et s'accumuler dans le cerveau (Meng et al., 2016). Le Tween 80 permet l'adsorption de l'apolipoprotéine E (apoE) sur la surface des nanoparticules qui vont être transportées dans le cerveau par l'endocytose médiée par le récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDL) (Gastaldi et al., 2014; Sun et al., 2004). Ainsi, le Tween 80 est considéré comme un agent de surface idéal pour les nanoparticules ciblant le cerveau.

7.4.3 Co-tensioactif

Un Co-tensioactif est un composé, qui additionné en proportions moindres, est capable de renforcer les propriétés d'un tensioactif principal pour améliorer les propriétés du mélange final.

Les poloxamères sont des copolymères non ioniques de polyoxyéthylène (POE) et de polyoxypropylène (POP), largement utilisés comme co-tensioactifs, agents émulsifiants, agents de dispersion et agents améliorant l'absorption in vivo (Lin and Kawashima, 1985). Tous les poloxamères ont des structures chimiques similaires mais avec des masses moléculaires et des compositions différentes du bloc hydrophile POE et du bloc hydrophobe POP.

Le Poloxamer 188 (Lutrol F-68), est un polymère séquencé d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène, d'un poids moléculaire moyen de 8350 Daltons. Il est hautement soluble dans l'eau et favorise l'absorption et la biodisponibilité d'actifs peu solubles (Reddy et al., 1976).

Le Poloxamer 188 s'est avéré être le meilleur co-tensioactif pour atteindre une taille de particule minimale et apporter une stabilité physique à la formulation. Ce fait peut être corroborer par l'hypothèse selon laquelle en raison de son faible poids moléculaire, le poloxamer 188 est préférentiellement adsorbé sur la surface des particules réduisant l'interaction interparticulaire et améliorant la dispersibilité des particules (Steckel and Brandes, 2004). Par conséquent, le poloxamer 188 a été sélectionné pour notre étude.

7.5 Préparation des SLN

Différentes techniques pour la fabrication des SLN sont détaillées dans la littérature (Ekambaram et al., 2012; Lippacher et al., 2000; Müller et al., 2000; Muller and Keck, 2004; Svilenov and Tzachev, 2014; Wissing and Müller, 2002). Dans notre étude, nous avons préparé les SLN selon la technique de l'ultrasonication.

7.5.1 Protocole

La phase lipidique constituée du Compritol et du Tween 80 est chauffée dans un bain marie à 80 °C. Ensuite l'extrait AT00X est solubilisé dans la γ -valérolactone et ajouté au Compritol fondu. La phase aqueuse chaude contenant le Poloxamer 188 est ajoutée à la phase lipidique fondue, et émulsifiée par un Ultra-Turrax à 15200 rpm pendant 10 min. Une pré-émulsion est formée, ensuite, les ultrasons sont appliqués à l'aide d'une sonde BRANSON à 70% pendant 12 min. La nanoémulsion chaude obtenue est ensuite refroidie dans un bain d'eau glacée pour former les SLN (Fig. 76).

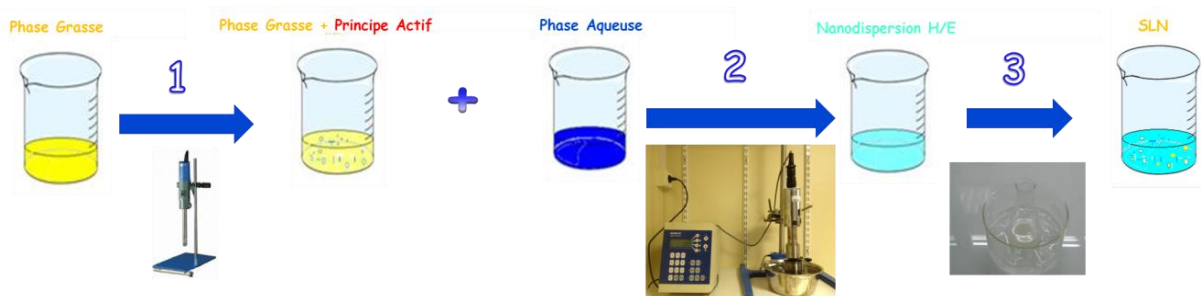


Fig. 76. Schéma de préparation des SLN par la méthode d'Ultrasonication. 1. Mélange à l'Ultraturax 15200rpm/10 min ; 2. Sonication à 70 % pendant 12 min ; 3. Refroidissement dans un bain d'eau glacé.

La formulation des SLN de l'extrait AT00X, est basée sur une étude approfondie de la littérature pour avoir une idée sur les meilleures proportions des différents ingrédients qui permettent d'obtenir des SLN stables dans le temps avec une distribution de taille homogène. Les différentes formulations de la littérature ont été testées dans notre laboratoire de pharmacie galénique, avec plusieurs actifs : Resvératrol, Curcumine, Bêta-carotène (Benhaïem-Henry, 2017) et acide zolédronique (Iarbi, 2015). Les résultats satisfaisants obtenus, ont fait l'objet de deux thèses. Pour poursuivre les travaux de mes collègues et améliorer les résultats, nous avons décidé de reprendre une formulation stable de SLN et l'adaptée à notre actif végétal :

- ❖ Corps gras : Compritol : 10 g
- ❖ Tensioactif : Tween 80 : 6 g
- ❖ Co-tensioactif : Lutrol F-68 : 4 g
- ❖ Actif : extrait AT00X : 400 mg
- ❖ Eau : 390 mL

Les résultats de taille et de potentiel zêta de cette formulation de base sont de l'ordre de 200 nm et -6 mV respectivement.

Nous avons souhaité vérifier l'innocuité du process sur l'activité de notre actif, pour cela, nous avons réalisé un essai d'évaluation de l'activité antioxydante des SLN AT00X selon le test KRL préalablement testé sur l'extrait AT00X en poudre, (cf chapitre 2, partie 2). Les résultats sont présentés dans les Tableau 27-28.

Tableau 27. Comparaison du pourcentage de variation du $T_{1/2}$ hémolyse du sang témoin en présence de l'extrait AT00X et des SLN-AT00X.

Concentrations (mg/L) *	% d'augmentation du $T_{1/2}$ hémolyse du sang témoin	Concentrations (mg/L) *	% d'augmentation du $T_{1/2}$ hémolyse du sang témoin
	SLN AT00X		Extrait AT00X
0	0	0	0
10	-6,16	1	4,83
20	-11,61	2	7,55
50	-9,47	5	16,28
100	-2,74	10	28,91
200	11,66	20	54,21
500	40,33	50	116,72
1000	88,12	100	201,52

Tableau 28. Equivalents mg de Trolox et mg d'acide gallique/g de SLN.

Concentrations (mg/L) *	Pouvoir antiradicalaire des SLN AT00X	
	Equivalents mg de Trolox et mg d'acide gallique/g de SLN	
	Trolox	Acide gallique
0	0	0
10	-242,23	-114,30
20	-228,25	-107,70
50	-74,47	-35,14
100	-10,79	-5,09
200	22,92	10,81
500	31,71	14,96
1000	34,65	16,35

* : Concentration en mg d'extrait/SLN par litre de milieu réactionnel

Nos résultats indiquent que les Nanoparticules AT00X, après une légère activité pro-oxydante, présentent une capacité antioxydante croissante à partir d'une concentration de 500 mg de SLN/L de milieu réactionnel.

Ainsi à une concentration de 500 mg SLN/L, les SLN-AT00X, augmentent respectivement la résistance du sang témoin à une attaque radicalaire de 40,33%. Dans ces conditions in vitro, un gramme de SLN-AT00X, présente une capacité antioxydante respectivement équivalente à 31,71 mg de Trolox® ou à 14,96 mg d'acide Gallique.

Sachant que les SLN AT00X testées au KRL contiennent 400 mg de l'extrait AT00X dans 410 g de masse totale de la formulation. Donc 1000 mg de SLN contiennent ~ 1 mg d'extrait AT00X. La variation du pourcentage du $T_{1/2}$ hémolyse du sang témoin en présence d'1 mg de l'extrait AT00X et de 1000 mg de SLN-AT00X qui contiennent 1 mg de l'extrait AT00X (Tableau 27), est respectivement 4,83 % et 88,12 %. Nous pouvons conclure que l'extrait AT00X dans les SLN est environ 20 fois plus efficace que l'extrait seul. Cette forte activité antioxydante des SLN, peut être due à la nature même des SLN connus pour pénétrer à travers la membrane lipidique des hématies grâce aux propriétés amphiphiles du Tween 80 (Pandey, 2014).

Le caractère pro-oxydant observé avec les faibles concentrations de SLN peut s'expliquer par plusieurs paramètres. En effet la stabilité de nos préparations testées, n'a été évaluée que sur 3 semaines (durée estimée entre le transit et les essais). Or il est apparu des dépôts de matières après plus de deux mois dans le noir et à température ambiante. Ces dépôts correspondent à un excédent d'actif non encapsulé mis en micro-suspension et des particules métalliques de la sonde à ultrasons. Ces particules peuvent avoir un rôle dans l'aspect pro-oxydatif mesuré qui est compensé par l'action antioxydante dose-dépendante de notre actif.

Il nous faut donc trouver pour la suite du développement une solution à l'encapsulation de l'actif non optimale.

7.5.1 Solvant

La formulation des SLN présente l'avantage de l'absence de solvants organiques. Or notre extrait AT00X sous forme de poudre est soluble partiellement dans la phase lipidique, d'où, la nécessité d'ajouter un solvant alimentaire, résistant au chauffage et miscible à la phase lipidique. La complexité de l'extrait et la richesse de sa composition en bois et en résines, nous a orienter vers les lactones vu leur grande capacité à solubiliser la lignine.

Les lactones sont des esters carboxyliques cycliques, contenant un groupe cétone lié à un hétérocycle. Elles sont utilisées comme arômes et parfums, bien qu'elles présentent également un caractère herbacé.

La γ -valérolactone est un composé organique de formule $C_5H_8O_2$. Ce liquide incolore à l'odeur d'herbe est l'une des lactones les plus courantes utilisées en parfumerie. Elle est facilement obtenue à partir de biomasse cellulosique suite à l'hydrogénation de l'acide lévulinique, et constitue un carburant potentiel et un solvant vert (Ferlin et al., 2018). Elle sera utilisée dans notre étude pour solubiliser l'extrait AT00X.

7.6 Optimisation de la formulation galénique

La formule de base pour cette étude d'optimisation, après avoir déterminé la proportion de lactone nécessaire pour incorporer un maximum d'actif solubiliser est la suivante :

- ❖ Corps gras : Compritol : 10 g
- ❖ Tensioactif : Tween 80 : 6 g
- ❖ Co-tensioactif : Lutrol : 4 g
- ❖ Solvant : γ -valérolactone : 30 mL
- ❖ Actif : extrait AT00X : 200 mg
- ❖ Eau : 390 mL

Le but de l'optimisation, est de trouver le meilleur compromis entre les trois ingrédients principaux : lipide, tensioactif, co-tensioactif, et étudier l'impact sur la taille des particules et l'encapsulation. Ces 3 facteurs constituent la base de la formulation des SLN et modifient leurs caractéristiques. A partir de cette formule de départ, nous avons défini le domaine de variation en précisant les bornes inférieures et supérieures des 3 facteurs étudiés :

$$X1: \quad 5 \text{ g} \leq \text{Compritol} \leq 15 \text{ g}$$

$$X2: \quad 2 \text{ g} \leq \text{Tween 80} \leq 10 \text{ g}$$

$$X3: \quad 1 \text{ g} \leq \text{Lutrol} \leq 8 \text{ g}$$

Les 3 réponses mesurées sont : la taille (Y1), le potentiel zêta (Y2) et l'indice de polydispersité (PDI) (Y3).

Nous avons fixé les autres paramètres de la formulation (eau à 390 mL, γ -valérolactone à 30 mL et l'extrait AT00X à 200 mg) et les paramètres du process (temps d'émulsification à 10 min, vitesse d'émulsification à 15200 rpm, temps de sonication à 12 min et fréquence de sonication à 70 %).

7.6.1 *Choix du plan*

Dans le cadre des expériences complexes, lorsque la relation entre la réponse et les entrées est inconnue, il est nécessaire alors d'utiliser des conceptions qui répartissent les points auxquels la réponse est observée de manière uniforme dans toute la région. Ces conceptions sont appelées « *Space-Filling Designs* » (SFD), et les plus connues sont les hypercubes latins (aléatoires, orthogonaux, optimisés) et les séquences à faible discrédance (Fang et al., 2006; Santner et al., 2003).

Au cours de la dernière décennie, les conceptions uniformes SFD ont été plus fréquemment utilisées depuis que les méthodes de conception expérimentale ont commencé à être appliquées aux expériences numériques.

Dans certains domaines, les expériences sont coûteuses et prennent du temps, il est alors avantageux de planifier et d'organiser les simulations comme dans le domaine des expériences et de travailler en haute dimension.

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé des conceptions SFD qui répartissent les points auxquels la réponse est observée de manière uniforme dans toute la région. Ce modèle est employé lorsque l'expérimentateur est confronté à des phénomènes chaotiques, ou plus simplement, si les relations entre la réponse et les entrées du code sont complexes. Nous avons employé une méthode de construction de nouvelles conceptions SFD, dite de WSP, basée sur l'algorithme de Wootton, Sergent, Phan-Tan-Luu. L'analyse des critères de qualité intrinsèques de ces conceptions en faisant varier le nombre de points et le type de l'ensemble candidat conduit à conclure que le type de la distribution initiale n'a pas d'importance si le nombre de points est suffisant. Cette conclusion révèle la robustesse de l'algorithme, même dans les espaces de grande dimension. La comparaison de ces conceptions avec les conceptions classiques de remplissage d'espace montre une meilleure qualité en ce qui concerne la répartition uniforme et le bon remplissage de l'espace. L'avantage de cet algorithme réside dans la possibilité de créer des conceptions uniformes dans des espaces de grandes dimensions avec un temps de calcul court.

7.6.2 *WSP design*

La construction des conceptions WSP est basée sur une sélection de points bien distribués selon l'algorithme proposé par Sergent and Phan-Tan-Luu, 1989. Dans cet algorithme, les points sont choisis parmi un ensemble de points candidats de manière à se trouver à une distance prédéfinie (d_{\min}) de chaque point de l'espace défini à paramètres multidimensionnels, déjà inclus dans la conception. De cette façon, l'espace des variables sera «plein» et couvert le

plus uniformément possible (Fig. 77). Il est important de souligner que, puisque l'algorithme n'ajoute aucun point, les points candidats initiaux sont importants et doivent être répartis uniformément dans l'espace étudié. Comme mentionné ci-dessus, l'algorithme WSP est une procédure de sélection et n'ajoute aucun point. Par conséquent, la distribution initiale doit remplir uniformément l'espace étudié car si certaines zones ne sont pas bien couvertes, elles seront mal représentées dans la conception finale et la présence de vides pourrait être préjudiciable pour une surface de réponse ultérieure.

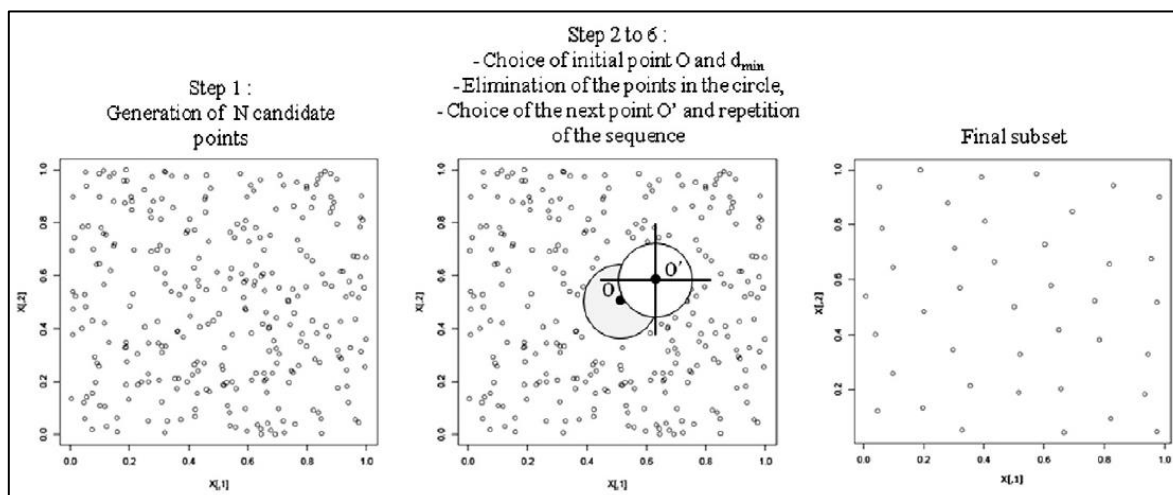


Fig. 77. Illustration de l'algorithme WSP dans un espace 2D (Santiago et al., 2012).

7.6.3 Plan d'expériences

Pour estimer les coefficients du modèle qui relie la variation des 3 réponses à la variation des quantités des 3 ingrédients, nous avons réalisé un plan uniforme de 34 expériences (Tableau 29). Comme nous désirons explorer le plus grand domaine d'étude possible, nous avons pris, pour chaque facteur, les bornes les plus élevées compatibles avec les contraintes de notre étude. Nous avons également prévu des points centraux pour estimer la variance expérimentale (Fig. 78). Les résultats des expériences sont rassemblés dans le tableau suivant.

Tableau 29. Matrice expérimentale du modèle.

N° Exp	Compritrol (g)	Tween 80 (g)	Lutrol (g)
1	8	7,1	7,4
1'	8	7,1	7,4
1''	8	7,1	7,4
1'''	8	7,1	7,4
2	14,9	2,1	7,9
2'	14,9	2,1	7,9
2''	14,9	2,1	7,9
2'''	14,9	2,1	7,9
3	12,1	9,4	2,0
4	6,1	3,2	7,3
5	14,1	6,1	2,2
6	13,7	6,7	7,0
7	6,7	4,3	3,8
8	5,4	2,5	1,1
9	8,2	10	7,8
10	10,8	9,8	6,1
10'	10,8	9,8	6,1
10''	10,8	9,8	6,1
10'''	10,8	9,8	6,1
11	13,7	3,3	1,7
11'	13,7	3,3	1,7
11''	13,7	3,3	1,7
11'''	13,7	3,3	1,7
12	8,9	2	4,9
13	5,3	2,1	5,1
14	5,6	5,6	5,9
15	14,2	4	4
16	12,3	8	4,2
17	9,1	4,5	6,7
18	14,3	9,3	6,2
19	8,9	2,3	1,3
20	13,1	3,9	6,4
21	10,8	3,6	3,2
22	7,8	8,6	5,3
23	8,4	5,1	1,7
24	9	8,5	1,1
25	6,2	8,1	2,6
26	5,1	8,8	7
27	5,1	6	1,1
28	10,8	2	7,4
29	15	9,9	3,8
30	9,9	5,9	4,5
31	15	8	1
32	5	10	1,3
33	7	9	1,5

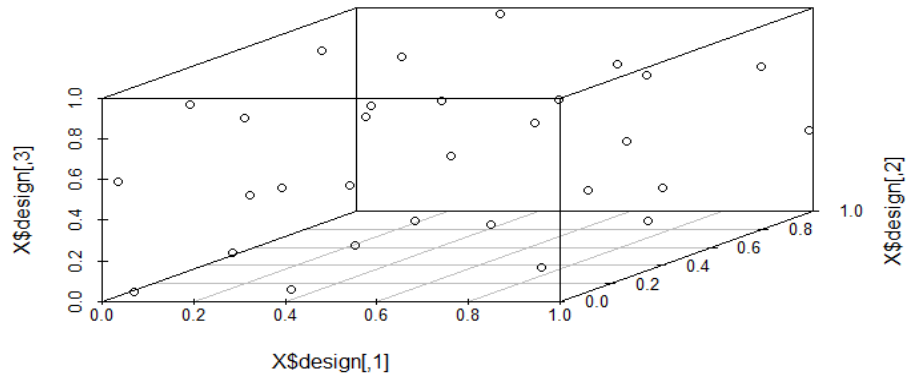


Fig. 78. Plan uniforme selon le modèle "Space-Filling Design".

L'effet de la variation des quantités des 3 ingrédients sur les 3 réponses, est étudiée selon le modèle polynomial du deuxième degré suivant :

$$\eta = \text{taille} = \text{potentiel } z\grave{e}\text{ta} = \text{PDI} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

Tableau 30. Matrice uniforme et résultats obtenus.

N°	Compritrol (g)	Tween 80 (g)	Lutrol (g)	Taille (nm)	P. Zêta (mV)	PDI
1	8	7,1	7,4	762,6	-9,14	0,425
1'	8	7,1	7,4	793,2	-6,09	0,315
1''	8	7,1	7,4	852,3	-6,56	0,019
1'''	8	7,1	7,4	841,5	-6,28	0,200
2	14,9	2,1	7,9	49,85	-11,1	0,359
2'	14,9	2,1	7,9	46,57	-5,39	0,465
2''	14,9	2,1	7,9	31,95	-4,91	0,537
2'''	14,9	2,1	7,9	46,07	-6,89	0,389
3	12,1	9,4	2,0	52,45	-8,17	0,799
4	6,1	3,2	7,3	37,43	-4,24	0,478
5	14,1	6,1	2,2	726,4	-3,99	0,329
6	13,7	6,7	7,0	302,5	-3,9	0,154
7	6,7	4,3	3,8	291,9	-3,72	0,170
8	5,4	2,5	1,1	430,9	-3,09	0,231
9	8,2	10	7,8	40,86	-3,81	0,542
10	10,8	9,8	6,1	26,55	-5,31	0,519
10'	10,8	9,8	6,1	43,58	-7,24	0,576
10''	10,8	9,8	6,1	40,43	-11	0,399
10'''	10,8	9,8	6,1	39,78	-6,69	0,509
11	13,7	3,3	1,7	313,5	-4,6	0,120
11'	13,7	3,3	1,7	392,3	-7,12	0,220
11''	13,7	3,3	1,7	386,3	-7,23	0,163
11'''	13,7	3,3	1,7	495,2	-6,81	0,181
12	8,9	2	4,9	51,65	-2,89	0,357
13	5,3	2,1	5,1	46,12	-2,94	0,493
14	5,6	5,6	5,9	158,1	-2,03	0,218
15	14,2	4	4	67,03	-2,88	0,265
16	12,3	8	4,2	19,38	-2,57	0,430
17	9,1	4,5	6,7	42,57	-2,99	0,256
18	14,3	9,3	6,2	37,15	-2,6	0,426
19	8,9	2,3	1,3	376,1	-2,14	0,147
20	13,1	3,9	6,4	49,1	-1,66	0,488
21	10,8	3,6	3,2	398,9	-2,29	0,129
22	7,8	8,6	5,3	32,01	-2,83	0,475
23	8,4	5,1	1,7	42,54	-2,59	0,452
24	9	8,5	1,1	30,7	-2,85	0,360
25	6,2	8,1	2,6	36,67	-2,62	0,460
26	5,1	8,8	7	41,06	-2,89	0,563
27	5,1	6	1,1	20,64	-2,35	0,440
28	10,8	2	7,4	42,64	-2,42	0,444
29	15	9,9	3,8	58,65	-2,11	0,644
30	9,9	5,9	4,5	353,2	-1,49	0,335
31	15	8	1	56,63	-9,05	1
32	5	10	1,3	65,82	-7,07	0,285
33	7	9	1,5	73,36	-6,55	0,274

34	13	10	1,4	102,6	-7,42	0,639
----	----	----	-----	-------	-------	-------

7.6.4 Analyse graphique du modèle

Dans le contexte des plans d'expériences pour l'étude de la variation des réponses en fonction des variables, et pour restituer de manière interprétable l'équation du modèle empirique, des plans de coupe sont réalisés en faisant varier à chaque fois 2 variables et en fixant la 3^{ème} au centre du domaine et aux deux bornes inférieure et supérieure. Deux formes géométriques ont été employées : les surfaces plot cube et la coupe correspondante. Seuls les plans les plus informatifs sont présentés ci-dessous.

7.6.5 Analyse de la taille

Selon ce plan d'expérience, le modèle polynomial gérant la variation de la taille par rapport aux 3 facteurs est calculé comme suit :

$$\eta = \text{taille} = 196.61 + -65.79X_1 + -54.88X_2 + 4.18X_3 + -21.77X_1^2 + -127.98X_2^2 + 99.70X_3^2 + -127.73X_1X_2 + 30.56X_1X_3 + 273.94X_2X_3$$

➤ *Variation de la taille des particules en fonction des 3 variables*

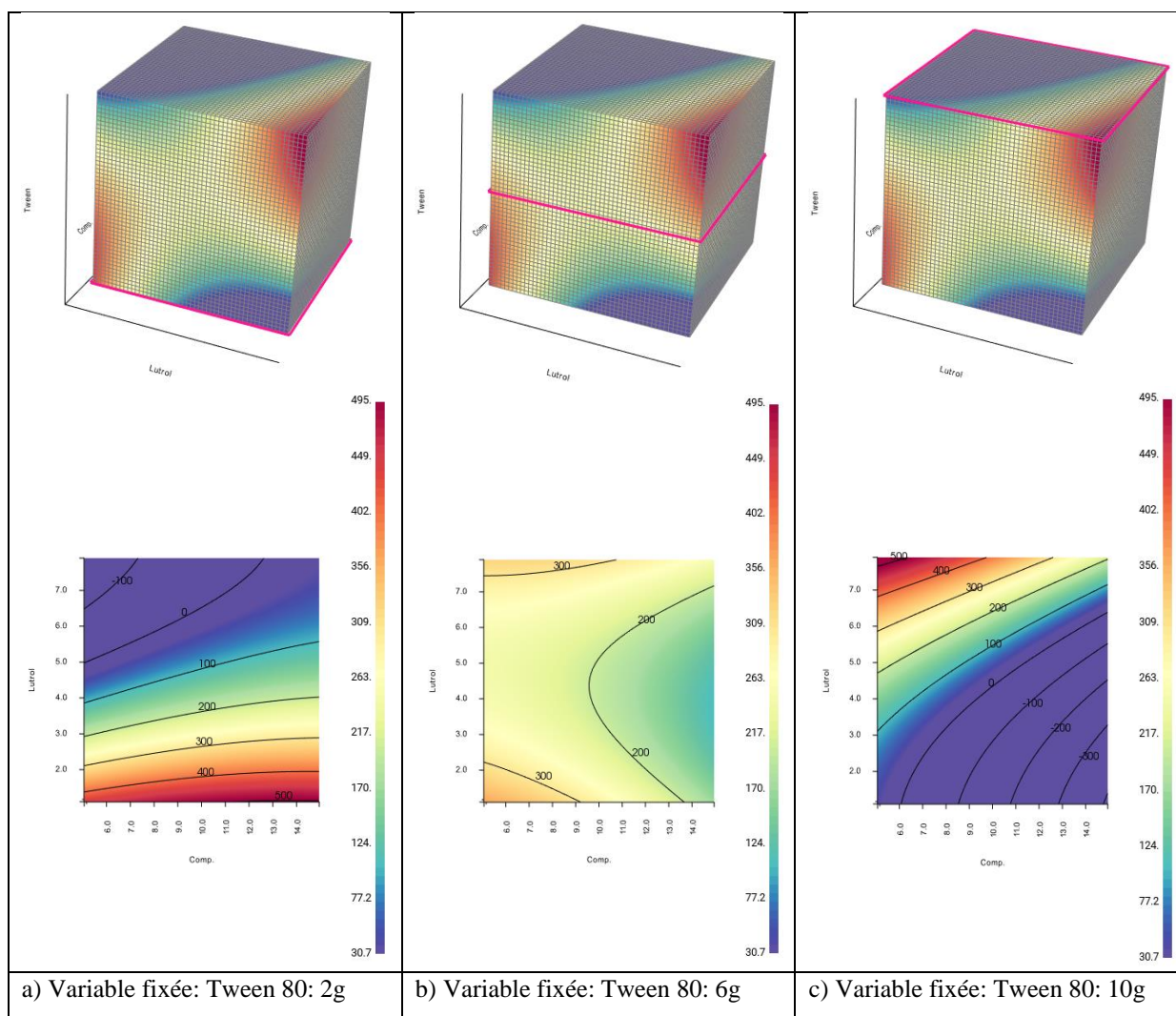


Fig. 79. Surface plot (cube + coupe) – réponse : taille (nm) – variables plan de coupe : Lutrol (g) – Compritol (g). Variable fixée : Tween 80 : 2 g, 6 g et 10 g.

Les 3 coupes du plan réalisées aux bornes et au centre du domaine de variation du Tween 80, montrent que pour une faible quantité de Tween 80, une grande quantité de Lutrol est nécessaire pour diminuer la taille des particules. De même, pour une quantité maximale de Tween 80, une faible quantité de Lutrol est suffisante pour obtenir une diminution de la taille (Fig. 79). Un équilibre du système émulsionnant (Tween 80 et Lutrol) est requis pour diminuer la taille. Le Compritol semble ne pas avoir un effet significatif dans la diminution de la taille des particules.

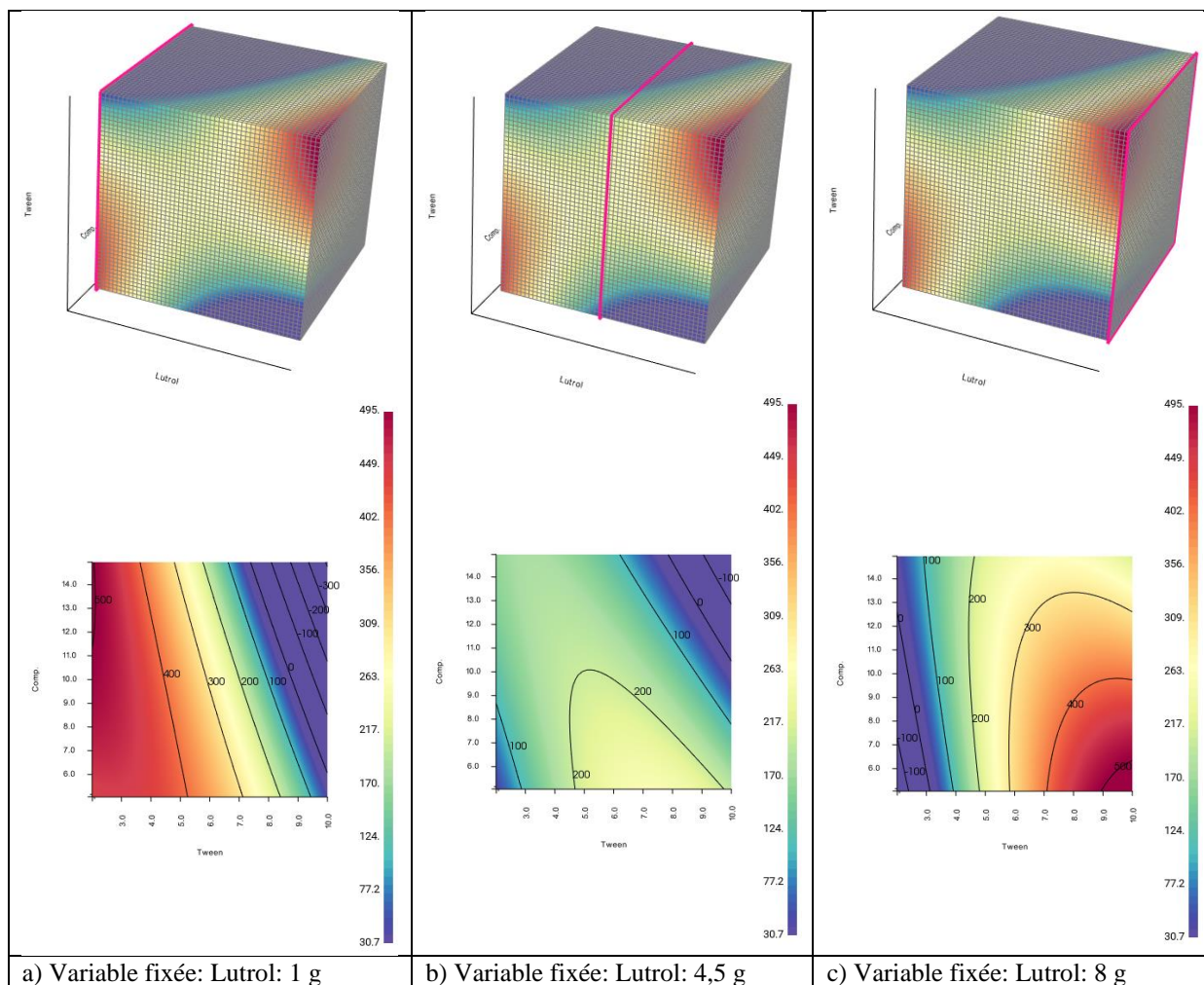


Fig. 80. Surface plot (cube + coupe) – réponse : taille (nm) – variables plan de coupe : Tween 80 – Compritol (g). Variable fixée : Lutrol : 1 g, 4,5 g et 8 g.

Les 3 coupes du plan réalisées aux bornes et au centre du domaine de variation du Lutrol, montrent que pour une faible quantité de Lutrol, une grande quantité de Tween 80 est nécessaire pour diminuer la taille des particules. De même, pour une quantité maximale de Lutrol, une faible quantité de Tween 80 est suffisante pour obtenir une diminution de la taille (Fig. 80). Un équilibre du système émulsionnant (Tween 80 et Lutrol) est requis pour diminuer la taille. Le Compritol semble ne pas avoir un effet significatif dans la diminution de la taille des particules. Nous remarquons que la combinaison Tensioactif/Co-tensioactif est responsable de la taille des particules.

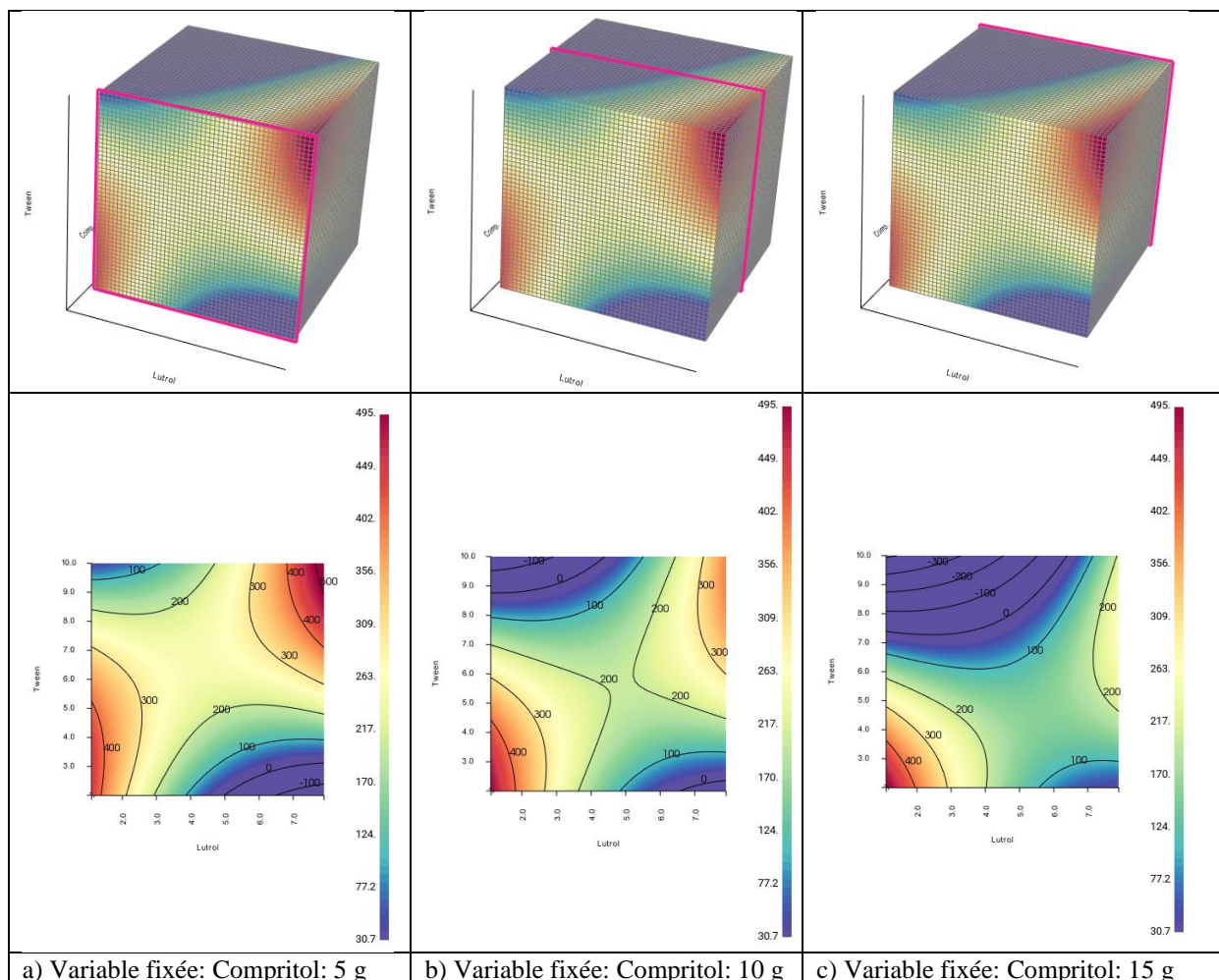


Fig. 81. Surface plot (cube + coupe) – réponse : taille (nm) – variables plan de coupe : Tween 80 (g) – Lutrol (g) Variable fixée : Compritol : 5 g, 10 g et 15 g.

Pour les 3 valeurs fixes du Compritol (5 g, 10 g et 15 g), la taille diminue avec l'augmentation du Tween 80 et une faible quantité de Lutrol ou bien une faible quantité de Tween 80 et une forte quantité de Lutrol (Fig. 81). Nous avons la même variation de la taille des particules en fonction du système émulsionnant.

7.6.6 Analyse du potentiel zêta

Selon ce plan d'expérience, le modèle polynomial gérant la variation du potentiel zêta par rapport aux 3 facteurs est calculé comme suit :

$$\eta = \text{potentiel zêta} = -1.34 - 0.24X_1 - 0.25X_2 + 0.44X_3 - 2.39X_1^2 - 1.36X_2^2 - 0.99X_3^2 + 1.62X_1X_2 + 1.14X_1X_3 - 0.26X_2X_3$$

➤ Variation du potentiel zêta des particules en fonction des 3 variables

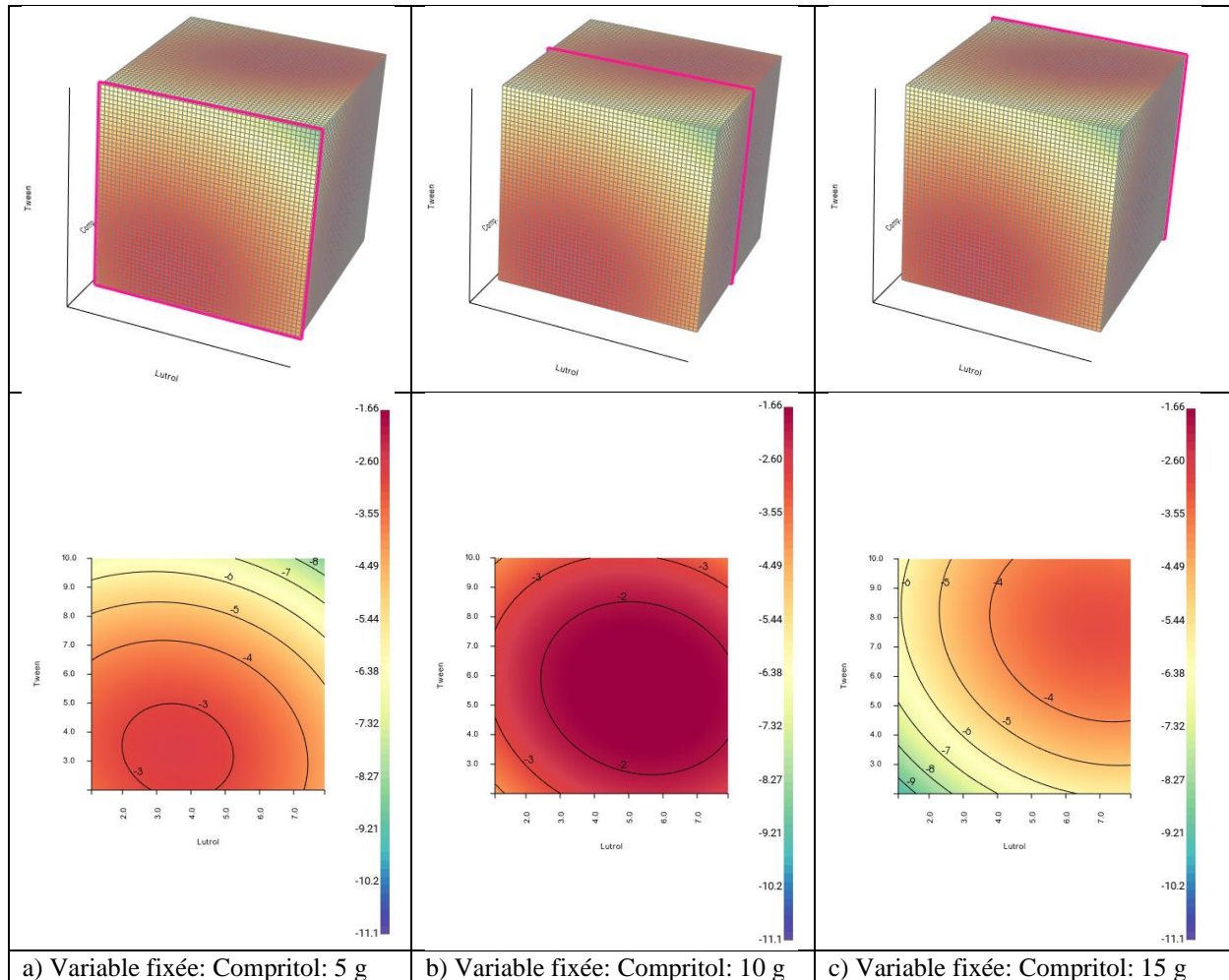


Fig. 82. Surface plot (cube + coupe) – réponse : potentiel zêta (mV) – variables plan de coupe : Tween 80 (g) – Lutrol (g) Variable fixée : Compritol : 5 g, 10 g, 15 g.

Pour une faible quantité de Compritol (5 g), il faut augmenter la quantité du Lutrol et du Tween 80 pour améliorer le potentiel zêta. Pour une quantité maximale de Compritol (15 g), il faut diminuer la quantité du système émulsionnant. A noter que la variation du potentiel zêta n'est pas significative et la modélisation est très peu pertinente (Fig. 82).

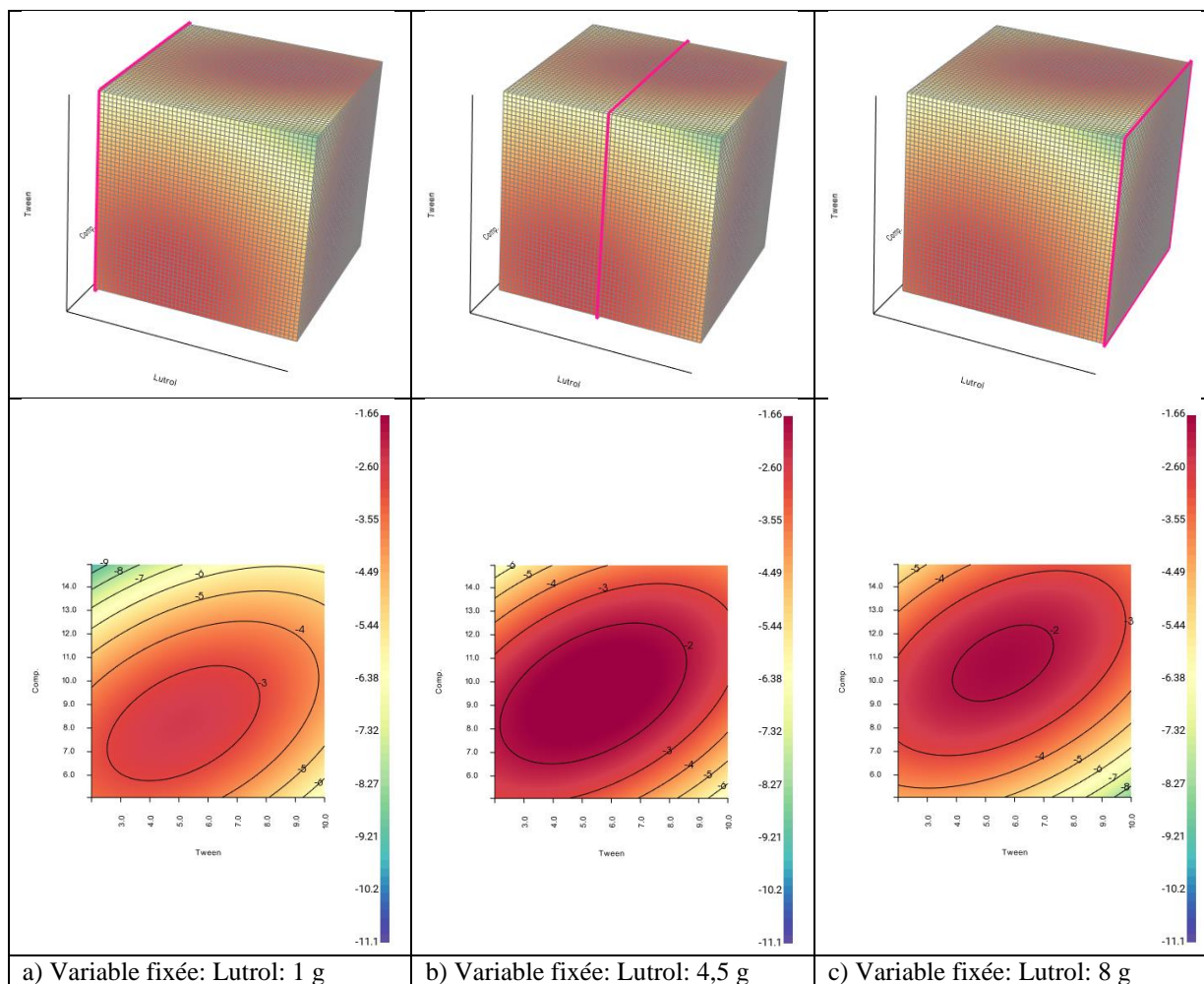


Fig. 83. Surface plot (cube + coupe) – réponse : potentiel zêta (mV) – variables plan de coupe : Tween 80 (g) – Compritol (g) Variable fixée : Lutrol : 1 g, 4,5 g, 8 g.

En fixant Lutrol à son niveau inférieur (1 g), le potentiel zêta augmente en valeur absolue avec l'augmentation de la quantité du Compritol et la diminution de la quantité du Tween 80. Pour une quantité maximale du Lutrol (8 g), le potentiel zêta s'améliore avec l'augmentation de la quantité du tween 80 et la diminution de la quantité du Compritol (Fig. 83). A noter que la variation du potentiel zêta n'est pas significative et la modélisation est très peu pertinente.

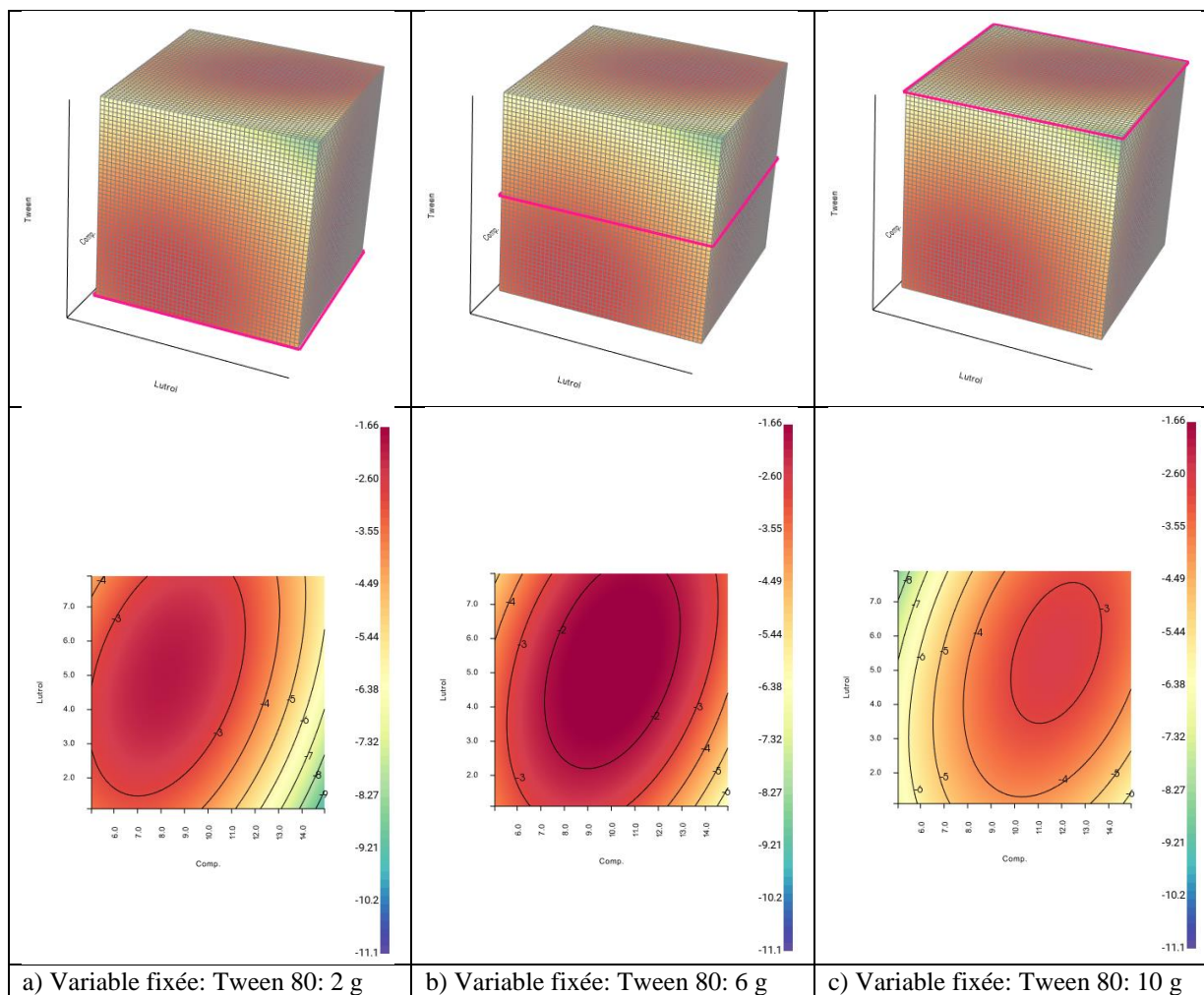


Fig. 84. Surface plot (cube + coupe) – réponse : potentiel zêta (mV) – variables plan de coupe : Lutrol (g) – Compritol (g) Variable fixée : Tween 80 : 2 g, 6 g, 10 g.

Une légère amélioration du potentiel zêta est détecté en augmentant la quantité du Compritol pour une faible quantité de Tween 80 et du Lutrol. Pour une quantité maximale du Tween 80, il faut augmenter la quantité du Lutrol et diminuer la quantité du Compritol pour optimiser le potentiel zêta (Fig. 84).

7.6.7 Analyse du l'index de polydispersité PDI

Selon ce plan d'expérience, le modèle polynomial géant la variation du PDI par rapport aux 3 facteurs est calculé comme suit :

$$\eta = \text{potentiel zêta} = 0.19 + 0.09X_1 - 0.01X_2 - 0.02X_3 + 0.06X_1^2 + 0.11X_2^2 - 0.004X_3^2 + 0.19X_1X_2 - 0.03X_1X_3 - 0.23X_2X_3$$

➤ *Variation du PDI des particules en fonction des 3 variables*

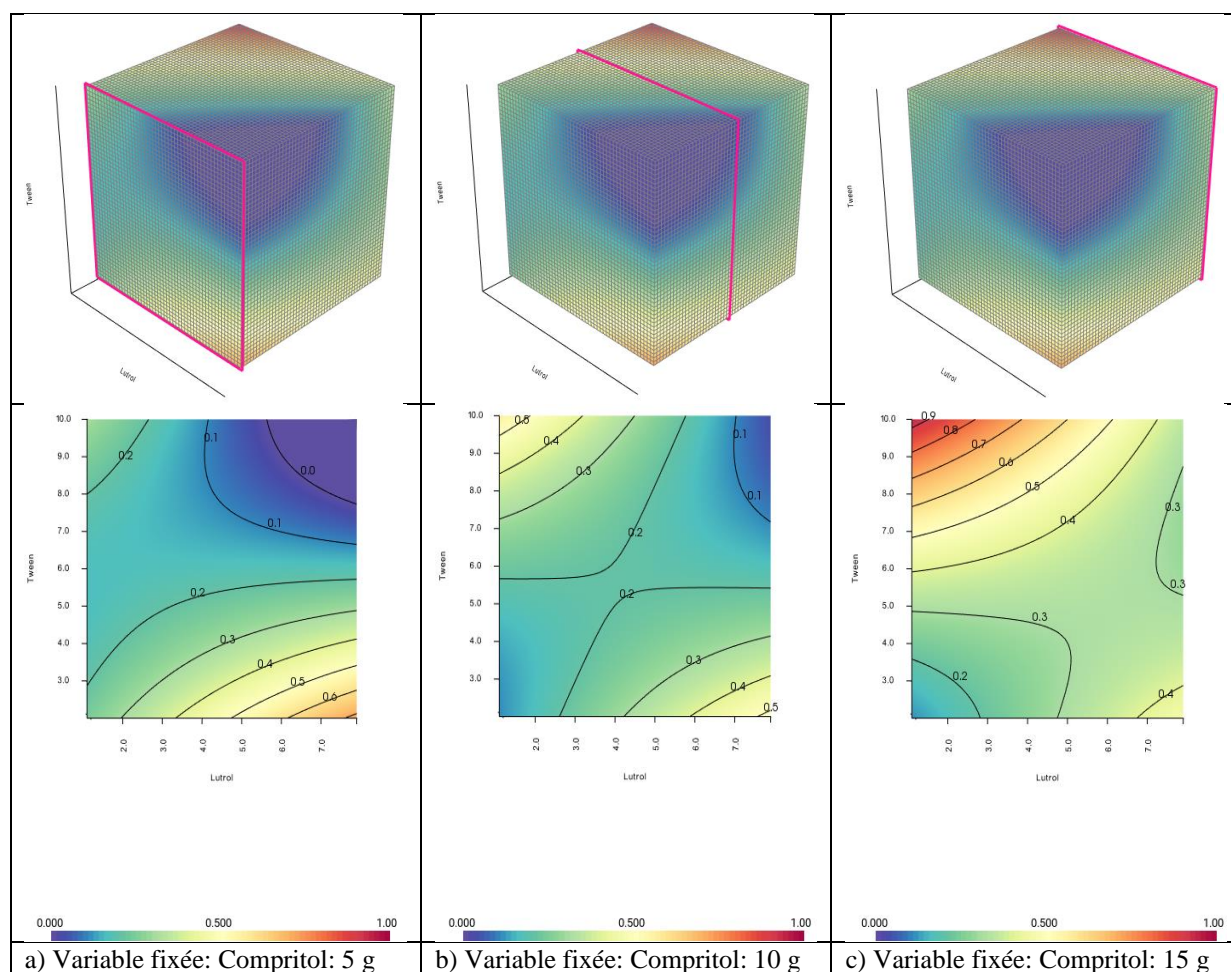


Fig. 85. Surface plot (cube + coupe) – réponse : PDI – variables plan de coupe : Lutrol (g) – Tween 80 (g)
Variable fixée : Compritol : 5 g, 10 g, 15 g.

Comme le montre la figure 85, pour une faible quantité de Compritol (5 g), il faut augmenter la quantité du Lutrol et diminuer celle du Tween 80 pour améliorer le PDI. Pour une quantité maximale de Compritol (15 g), il faut augmenter la quantité du Tween 80 pour améliorer le PDI.

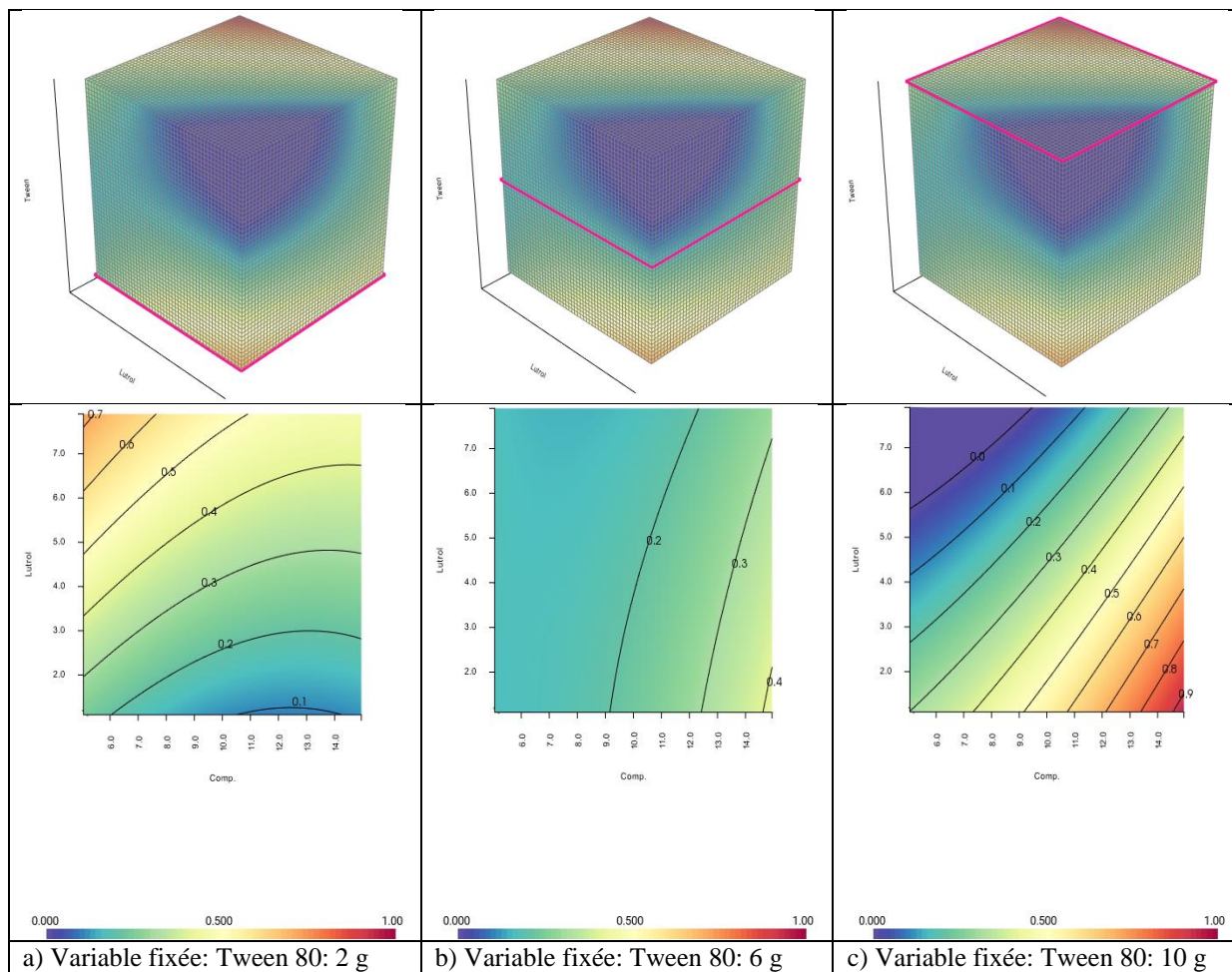


Fig. 86. Surface plot (cube + coupe) – réponse : PDI – variables plan de coupe : Lutrol (g) – Compritol (g), Variable fixée : Tween 80 : 2 g, 6 g, 10 g.

Pour une faible quantité de tween 80 (2 g), il faut augmenter la quantité du Lutrol pour améliorer le PDI. Pour une quantité maximale de tween 80 (10 g), il faut augmenter la quantité du Compritol et diminuer celle du Lutrol pour améliorer le PDI (Fig. 86).

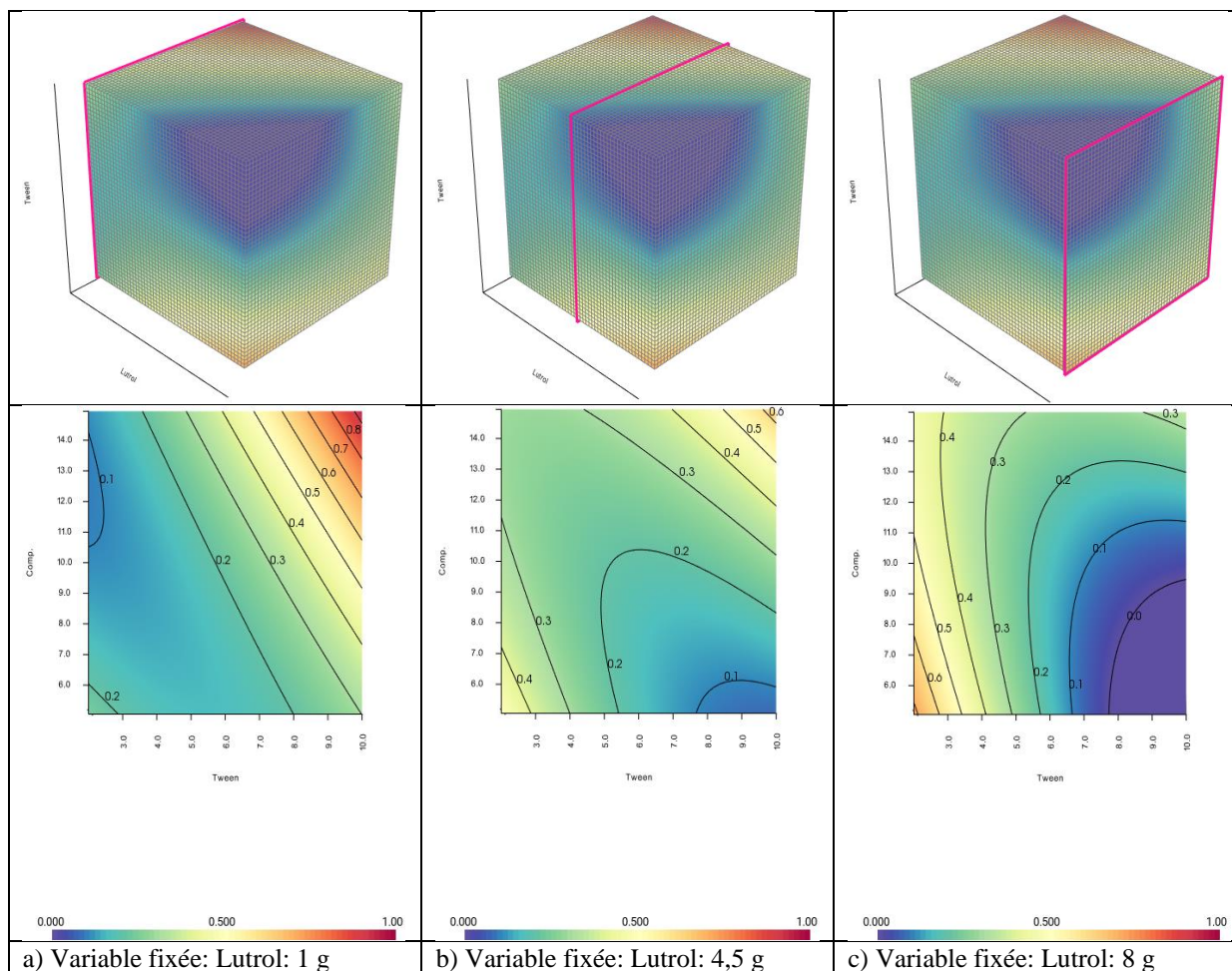


Fig. 87. Surface plot (cube + coupe) – réponse : PDI – variables plan de coupe : Tween 80 (g) – Compritol (g), Variable fixée : Lutrol : 1 g, 4,5 g, 8 g.

En fixant le Lutrol à son niveau inférieur (1 g), le PDI augmente avec l’augmentation des quantités du Compritol et du Tween 80. Pour une quantité maximale du Lutrol (8 g), le PDI s’améliore avec la diminution des quantités du tween 80 et du Compritol (Fig. 87). A noter que la variation du potentiel zêta n’est pas significative et la modélisation est très peu pertinente.

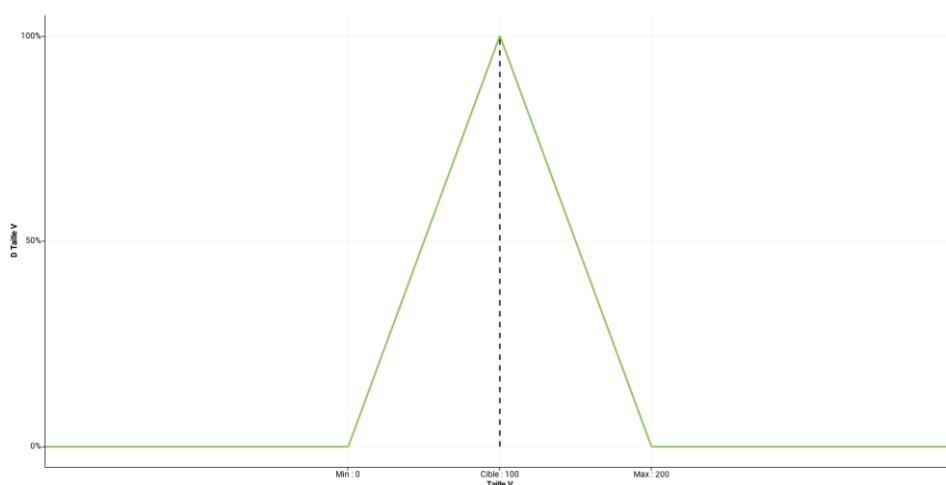
7.6.8 Désirabilité

Après avoir étudié la variation de la taille, du potentiel zêta et du PDI en fonction des 3 variables, il est nécessaire de définir une zone de désirabilité qui correspond à nos objectifs. Dans le cas de notre étude, nous recherchons une taille des SLN de 100 nm et un potentiel zêta de -8 . Nous n’avons pas de préférence pour le PDI, il suffit d’avoir une valeur de PDI entre 0,08 et 0,7 pour avoir une polydispersité moyenne (Tableau 31).

Tableau 31. Etude de désirabilité.

	Taille (nm)	P Zêta (mV)	P.D.I.
Préférence	Bilatérale	Unilatérale droite	Aucune
Cible	100	-8	50
Min	0	0	0
Max	200	-5	100

Les nanoparticules lipidiques solides de taille ne dépassant pas les 200 nm sont susceptibles de traverser la barrière hémato-encéphalique sans être éliminées par le système réticulo-endothéliale. Nous avons fixé une désirabilité de 0 à 200 nm avec une cible de 100 nm (Fig. 88).

**Fig. 88.** Désirabilité de la taille. Type : Bilatérale ; Min : 0, Max : 200 nm, Cible : 100 nm.

La charge des nanoparticules joue un rôle important dans la stabilité de la formulation. Dans le cas de notre étude, les ingrédients non-ioniques utilisés ne permettent pas l'obtention d'un potentiel zêta élevé. La désirabilité du potentiel zêta sélectionnée de type unilatérale droite, varie entre un maximum de -5 mV et une cible de -8 mV (Fig. 89).

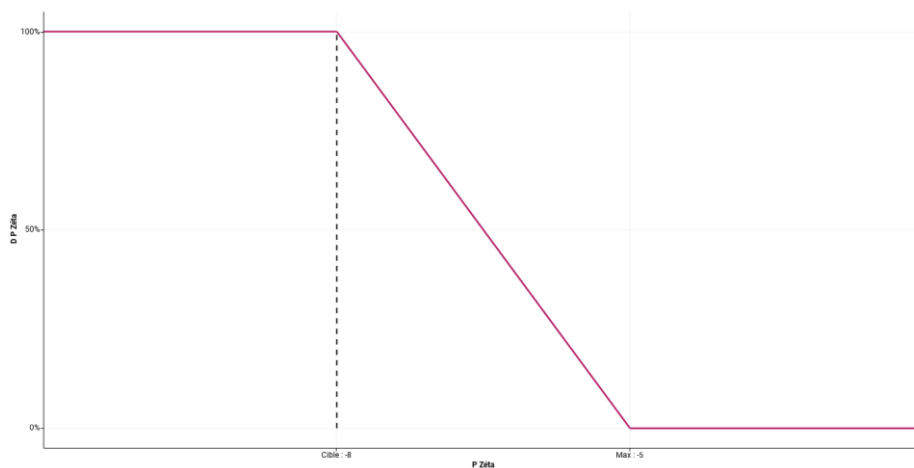


Fig. 89. Désirabilité du potentiel zêta. Type : Unilatérale droite ; Max : -5 mV Cible : -8 mV.

L'optimisation graphique en fonction de l'étude de désirabilité, aboutit à une zone optimale représentée par des surfaces de réponses (cube). Cette zone optimale est visualisée en fixant le Tween 80 et le Compritol à leurs niveaux minimal (2 g et 5 g) et maximal (10 g et 15 g) respectivement (Fig. 90 et Fig. 91).

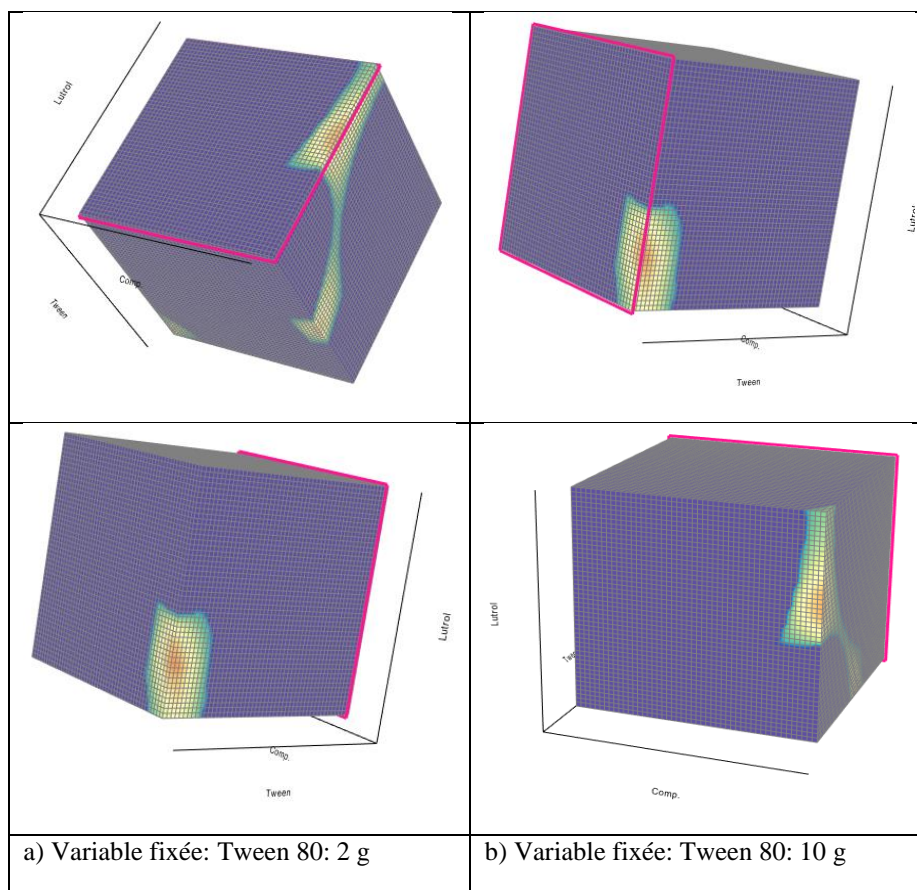


Fig. 90. Désirabilité surface plot (Cube) - Réponse : Taille - Variables plan de coupe : Compritol (g) - Lutrol (g). Variable fixée : Tween 80 : 2 g, 10 g.

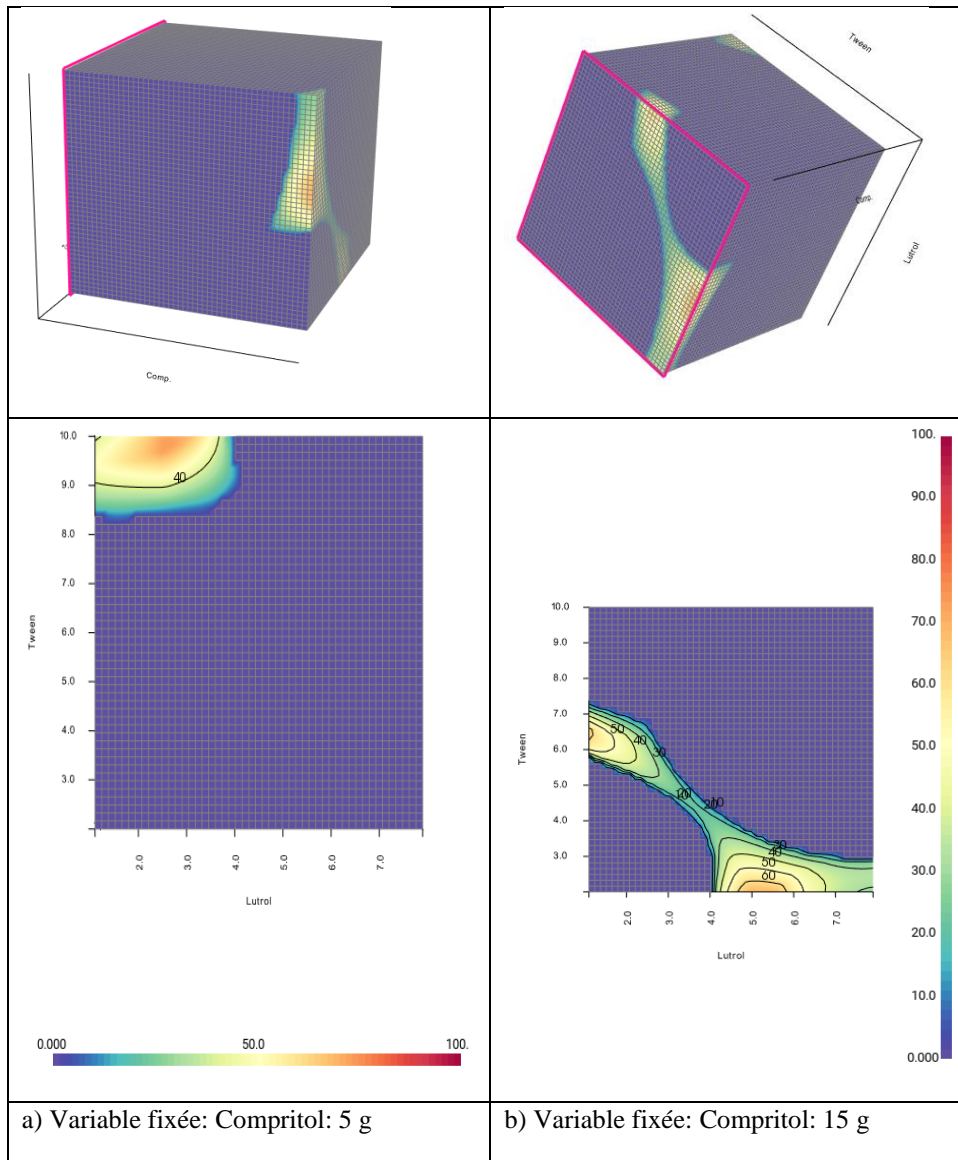


Fig. 91. Désirabilité surface plot (Cube) - Réponse : Taille - Variables plan de coupe : Tween 80 (g) - Lutrol (g). Variable fixée : Compritol : 5 g, 15 g.

D'après ces plans de coupes, nous constatons la présence d'une zone optimale avec une multitude de points expérimentaux optimaux (zone jaune/verte). Nous avons sélectionné de cette zone, 4 formulations optimales qui répondent à l'étude de désirabilité (Tableau 32).

Tableau 32. Formulations optimales sélectionnées.

Formulation	Compritol (g)	Tween 80 (g)	Lutrol (g)
35	14,9	2	5,38
36	14,9	6,28	1,12
37	5,04	9,68	2,43
38	15	2	8

Le Tableau 33 présente les résultats de taille, de potentiel zêta et de PDI des 4 formulations sélectionnées de la zone optimale.

Tableau 33. Taille, potentiel zêta et PDI des 4 formulations optimales sélectionnées.

Formulation	Compritol (g)	Tween 80 (g)	Lutrol (g)	AT00X (g)	Lactone (mL)	Eau (mL)	Taille (nm)	P Zêta (mV)	P.D.I.
35	14,9	2	5,38	0,2	30	390	45,73	-3,96	0,447
36	14,9	6,28	1,12	0,2	30	390	1113	Q.R	0,047
37	5,04	9,68	2,43	0,2	30	390	59	-4,12	0,499
38	15	2	8	0,2	30	390	46,42	-6,96	0,502

*Q.R : refer to quality report

Parmi les 4 formulations de la zone optimale, nous allons retenir la formulation 38 pour la suite de l'étude avec 15 g de Compritol, 2 g de Tween 80 et 8 g de Lutrol.

7.7 Caractérisation des SLN

7.7.1 Taille des Particules

La taille moyenne, le potentiel zêta et l'indice de polydispersité (PDI) des Nanoparticules ont été mesurés par diffusion dynamique de la lumière à l'aide d'un appareil Zetasizer Nano ZS (*Malvern Instruments*). Le Zetasizer Nano ZS est un analyseur de particules et de tailles moléculaires très performant, conçu pour la détection améliorée des agrégats. Le principe de la diffusion dynamique de la lumière est que les particules fines en mouvement thermique constant, appelé mouvement brownien, diffusent à une vitesse liée à leur taille. L'intensité diffusée par des grosses particules varie moins vite au cours du temps que pour des petites particules (Fig. 92). La vitesse du mouvement brownien est également déterminée par la température. Par conséquent, un contrôle précis de la température est essentiel pour une mesure précise de la taille.

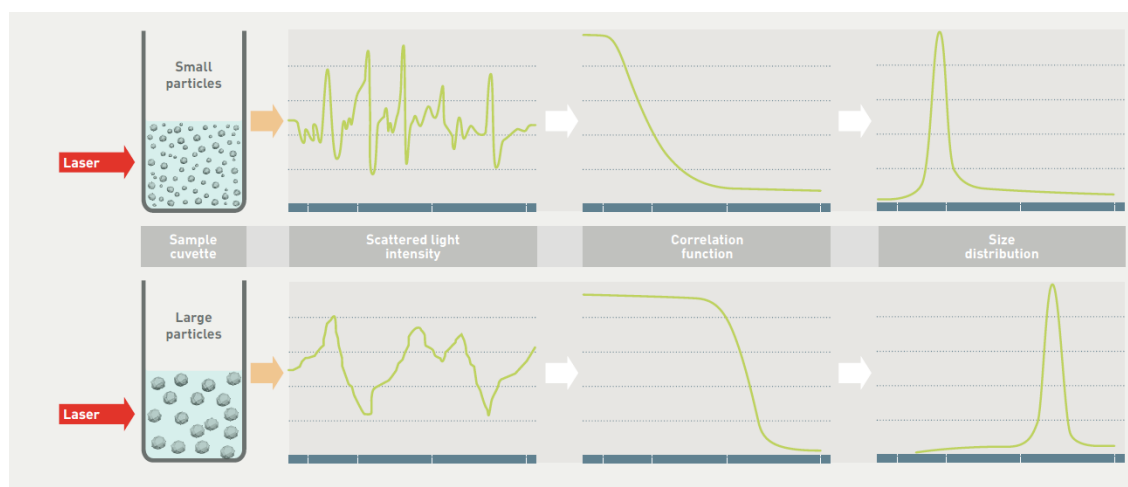


Fig. 92. Distribution de taille selon le principe de la diffusion dynamique de la lumière.

Pour mesurer la vitesse de diffusion, des rayons laser frappent l'échantillon. L'intensité de diffusion à un angle donné fluctuera avec le temps, ce qui est détecté à l'aide d'un détecteur à photodiode à avalanche sensible. Les changements d'intensité sont analysés avec un autocorrélateur numérique qui génère une fonction de corrélation. Cette courbe peut être analysée pour donner la taille et la distribution en taille. Les dimensions des particules sont déterminées dans la gamme submicronique, et même dans la gamme du nanomètre. Les échantillons sont dilués au 1/50 et les mesures ont été effectuées 3 fois (Fig. 93).

Results

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 102,1	Peak 1: 46,42	95,4	13,98
Pdl: 0,502	Peak 2: 471,5	4,2	194,4
Intercept: 0,952	Peak 3: 5006	0,3	846,7
Result quality Good			

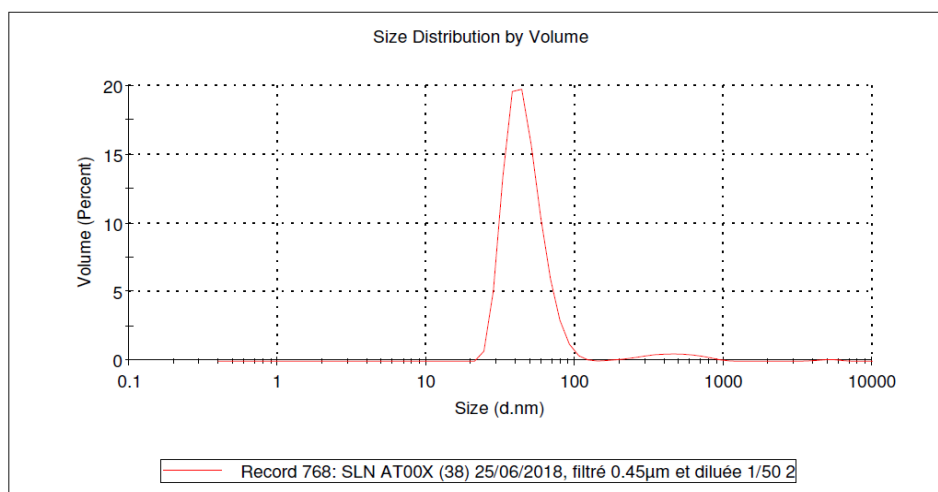


Fig. 93. Taille et PDI de la formulation optimale SLN AT00X 38.

7.7.2 Potentiel zêta

La charge acquise par une particule ou une molécule dans un milieu donné est son potentiel zêta et provient de la charge de surface, de la concentration et des types d'ions dans la solution. Étant donné que les particules de charge similaire se repoussent, celles à charge élevée résistent à la floculation et à l'agrégation pendant de plus longues périodes, ce qui rend ces échantillons plus stables. Cela signifie que la stabilité peut être modifiée en modifiant le pH, la concentration ionique, le type d'ions et en utilisant des additifs tels que des tensioactifs et des polyélectrolytes.

Le Zetasizer Nano ZS comprend également un analyseur de potentiel zêta utilisant la diffusion électrophorétique de la lumière pour les particules, les molécules et les surfaces. La

mesure du potentiel de surface par le potentiel zêta est basée sur la présence de charges provenant du polymère ou des tensioactifs adsorbés (Fig. 94).

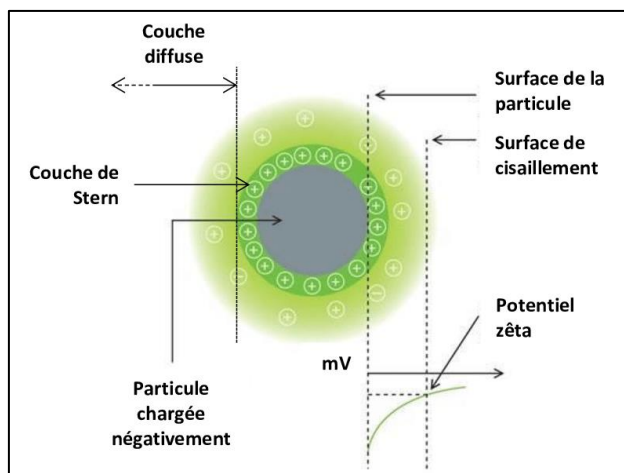


Fig. 94. Présentation schématique du potentiel zêta (Plusquellec, 2014).

Le potentiel zêta peut être mesuré par l'intermédiaire de la mobilité électrophorétique des particules (déplacement dans un champ électrique), il permet de prédire la stabilité au stockage des nanoparticules en suspension et les interactions par attractions électrostatiques. En général, les particules chargées sont moins susceptibles d'être agrégées par la répulsion électrique. Le potentiel zêta de la formulation optimale SLN AT00X 38 est présenté dans la figure suivante (Fig. 95).

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -6,96	Peak 1: -6,96	100,0	5,15
Zeta Deviation (mV): 5,15	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0196	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality Good

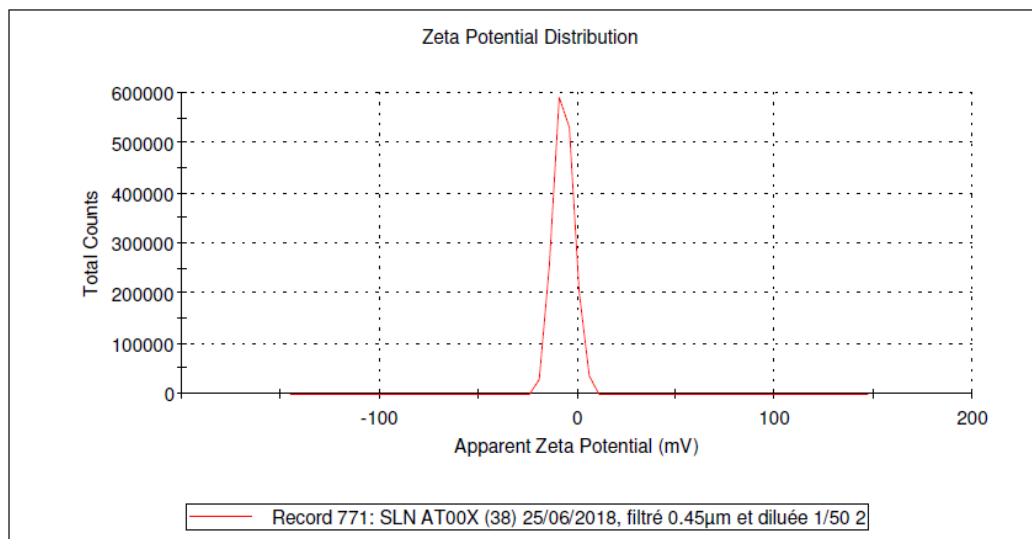


Fig. 95. Potentiel zêta de la formulation optimale SLN AT00X 38.

7.7.3 PDI

Après la préparation, les SLN doivent être caractérisés pour assurer leur adéquation aux applications *in vitro* et *in vivo*. En ce qui concerne la caractérisation de la distribution granulométrique, un paramètre utilisé pour définir la plage de taille des systèmes nanoparticulaires lipidiques est appelé «indice de polydispersité» (PDI). Le terme «polydispersité» est utilisé pour décrire le degré de non uniformité d'une distribution de taille des particules (Bera et al., 2015). Également appelé indice d'hétérogénéité, le PDI est un nombre calculé à partir d'un ajustement de deux paramètres aux données de corrélation (analyse des cumulants). Cet indice est sans dimension et mis à l'échelle de sorte que les valeurs inférieures à 0,05 sont principalement observées avec des normes hautement monodisperses. Des valeurs de PDI supérieures à 0,7 indiquent que l'échantillon présente une distribution de taille de particule très large et qu'il est probablement impropre à être analysé par la technique de diffusion dynamique de la lumière. Notre formulation optimale SLN AT00X 38 présente une polydispersité moyenne, avec une valeur de PDI qui se situe entre 0,08 et 0,7 (Fig. 93).

7.7.4 Stabilité des SLN

L'analyse de la stabilité colloïdale et la détermination de la durée de conservation sont des critères essentiels dans les études de formulation d'émulsions, de suspensions et de mousses. Le TURBISCAN LAB® (Formulation Company, France) permet une identification rapide et sensible des mécanismes de déstabilisation dans des milieux dispersés concentrés (crémage, sédimentation, floculation, coalescence). Une cellule de mesure à température contrôlée permet soit de contrôler la stabilité à une température de stockage spécifique, soit d'accélérer le processus de déstabilisation. L'instrument détecte non seulement l'évolution de la stabilité à un stade précoce, jusqu'à 200 fois plus rapidement que les tests visuels, mais il quantifie également l'altération globale de la formule à l'aide d'une échelle TSI (*Turbiscan Stability Index*).

Le Turbiscan est basé sur le principe de la diffusion statique multiple de la lumière. Cette technique consiste à envoyer des photons (lumière) dans l'échantillon. Ces photons, après avoir été dispersés plusieurs fois par des objets en suspension (gouttelettes, particules solides, bulles de gaz) émergent de l'échantillon et sont détectés par le dispositif de mesure du Turbiscan (Fig. 96). La diffusion statique multiple de la lumière peut être utilisée pour analyser des formulations sans dilution ni perturbation de la forme initiale. Par conséquent, elle offre une détermination plus précise des phénomènes physiques survenant au fil du temps dans des formulations complexes.

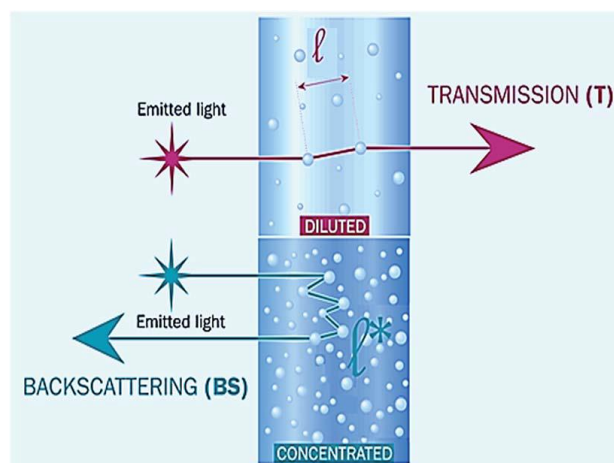


Fig. 96. Principe de l'analyseur de stabilité TURBISCAN (Lu et al., 2017).

Le profil de rétrodiffusion (24 h et 12 mois après la préparation) des SLN AT00X 38 est illustré par la figure 97. L'axe X représente la hauteur du tube, tandis que l'axe Y représente le pourcentage de variation de la rétrodiffusion par rapport à l'état initial. Les couleurs des

courbes sur le deuxième axe Y correspondent aux différents temps du test. Les droites bleue et rouge correspondent aux mesures effectuées à t_{24h} et t_{1an} respectivement.

Comme le montre la figure 97, aucun changement du profil de la rétrodiffusion de l'échantillon analysé à deux temps différents, ce qui indique qu'il n'y a pas de croissance ou de migration de particules évidente dans la solution. La droite rouge présente un léger décalage (1%) par rapport à l'analyse originale représentée par la droite bleue à la suite d'un changement de température pendant 1 an qui a entraîné une évaporation ou une densification de l'échantillon (les particules sont un peu plus resserrées) (Fig. 99).

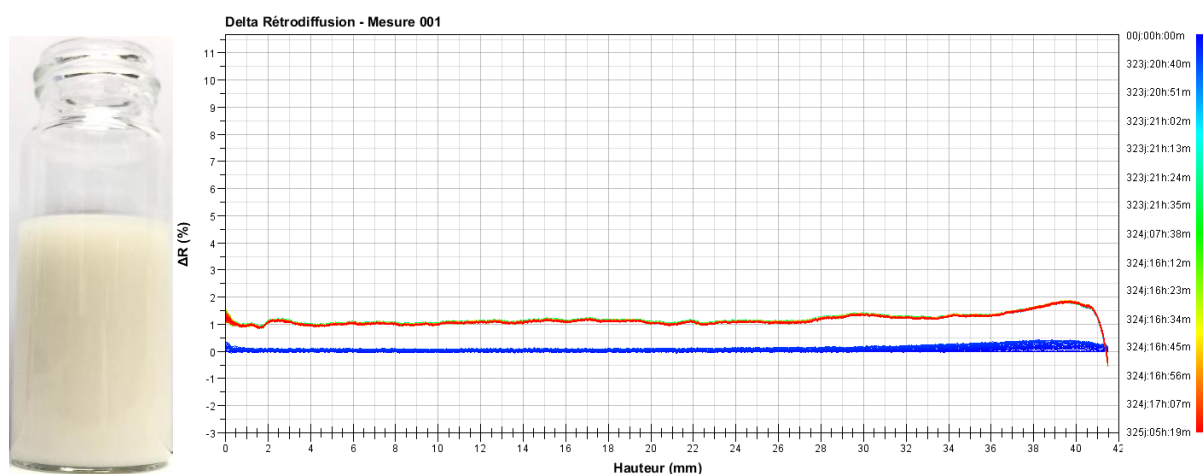


Fig. 97. Profil de rétrodiffusion des SLN AT00X 38.

Les valeurs du TSI sont calculées et tracées en fonction du temps (Fig. 98). Le TSI, indicateur des phénomènes de déstabilisation, présente une légère augmentation négligeable (< 5), due à un effet migratoire des particules en surface. Cet effet non significatif pendant un an n'affecte pas la stabilité de la formulation. La mesure globale du TSI indique une bonne stabilité de la formulation.

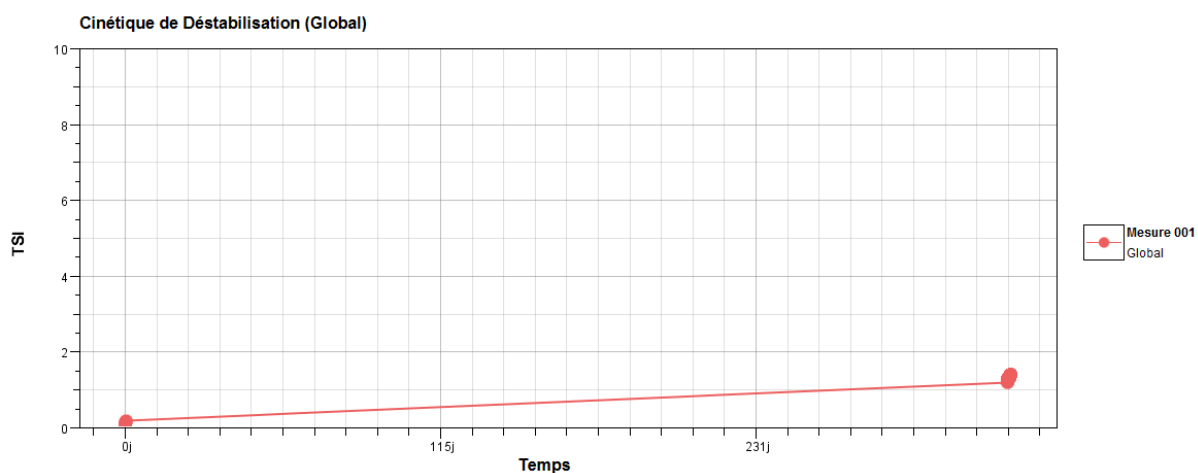


Fig. 98. Évolution du TSI des SLN AT00X 38.

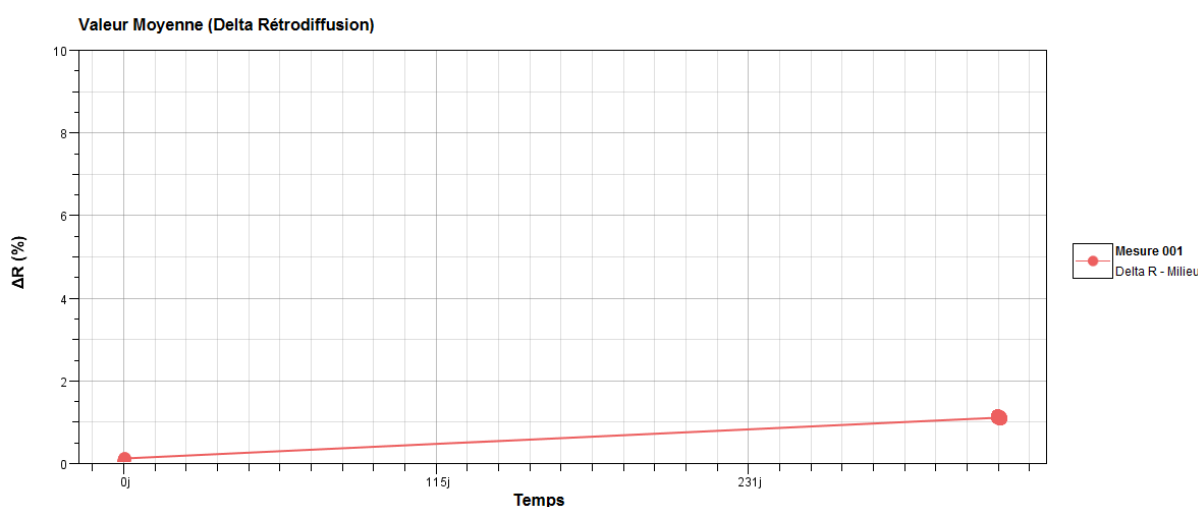


Fig. 99. Évolution de la valeur moyenne de la rétrodiffusion des SLN AT00X 38.

7.7.5 Efficacité d'encapsulation des SLN

L'efficacité d'encapsulation de l'extrait AT00X dans les SLN a été déterminée par la technique d'ultrafiltration en mesurant la quantité de médicament encapsulée dans les nanoparticules selon la méthode de (Das et al., 2012) avec quelques modifications. 500 μ L de SLN de la formulation optimale (SLN AT00X 38) sont introduits dans un dispositif centrifuge Amicon Ultra-4 10K, (Millipore, Irlande), avec une membrane de coupure de poids moléculaire de 10kDa. Une centrifugation à 20 °C pendant 30 min à 6000 rpm a été réalisée à l'aide d'une Centrifugeuse Eppendorf 5804 R (Fig. 100). Le surnageant récupéré est ensuite analysé afin de déterminer la concentration d'extrait encapsulé par dosage HPLC (même protocole chapitre 2, partie 4).

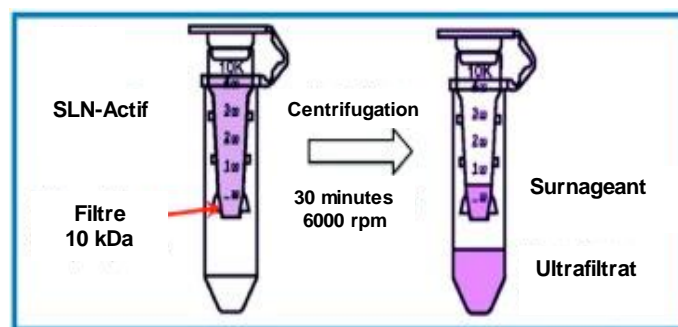


Fig. 100. Protocole d'ultrafiltration des SLN.

7.7.5.1 Dosage de l'extrait AT00X dans les SLN

Pour déterminer la quantité d'extrait encapsulé, nous avons besoin d'un étalon pour effectuer le calcul. Vu la complexité de l'extrait et la richesse en molécules, nous avons choisi l'acide benzoïque comme étalon. Pour cela, Une solution mère a été préparée en ajoutant ($m = 10$ mg) d'acide benzoïque dans 1 mL de MeOH. À partir de cette solution mère (10 mg/mL), une solution fille de concentration 25 $\mu\text{g/mL}$ a été préparée (dilution 1/400). Afin de tracer la courbe étalon (Fig. 101), on injecte 5, 10, 15 et 20 μL de cette solution fille d'acide benzoïque en HPLC (Tableau 34).

Tableau 34. Aires du pic des différentes quantités injectées de l'acide benzoïque.

Volume injecté (μL)	Quantité injecté (μg)	Aire du pic ($\mu\text{V} \cdot \text{sec}$)
0	0	0
5	0,125	474025
10	0,25	966399
15	0,375	1447339
20	0,5	1739586

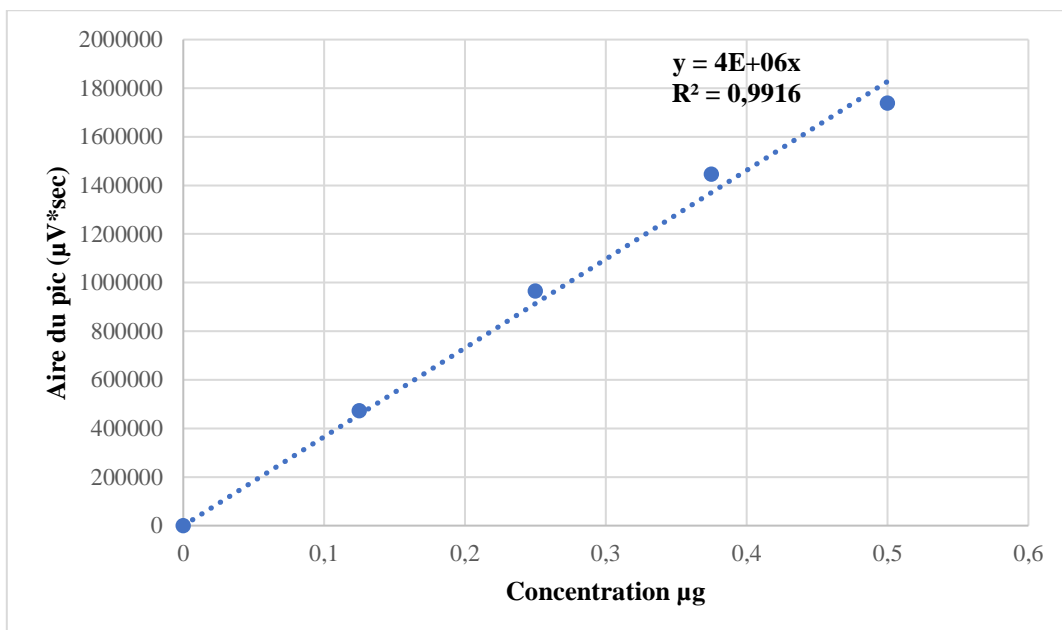


Fig. 101. Courbe étalon de l'acide benzoïque.

250 µL d'ultrafiltrat (eau + extrait dissous) et 250 µL de surnageant (SLN + extrait encapsulé) ont été récupérés. Ensuite du méthanol (1 mL) est ajouté au surnageant et bien mélangé à l'aide d'un vortex. Cela a facilité l'extraction de l'extrait du lipide au méthanol. Le mélange a ensuite été centrifugé pendant 15 min à 13200 rpm et le surnageant a été recueilli. La concentration de l'actif dans le surnageant a été mesurée par dosage en injectant 10 µL en HPLC (Tableau 35). La visualisation des pics est réalisée à $\lambda = 274$ nm.

Tableau 35. Aire du pic du surnageant des SLN.

Echantillons	Volume injecté (µL)	Aire du pic (µV*sec)
Surnageant SLN AT00X 38	10	99871
Ultrafiltrat (eau + extrait dissous)	10	105578

L'efficacité d'encapsulation de l'extrait (EE) a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$(EE)\% = \frac{\text{Concentration totale} - \text{Concentration non encapsulée}}{\text{Concentration totale}}$$

Selon l'équation précédente, nous avons obtenu une efficacité d'encapsulation de 79,36%.

7.7.6 Dialyse à l'équilibre

L'étude de libération de l'actif a été réalisée selon la méthode de la membrane de dialyse (Das et al., 2011; Hu et al., 2004). La dialyse est un procédé de séparation par membrane semi-perméable des molécules ou des ions en solution selon un gradient de concentration. L'avantage de cette méthode réside dans le fait que les séparations se font dans la majeure partie des cas à température ambiante, respectant ainsi les substances thermolabiles, sans changement de phase liquide (avantageux sur le plan énergétique) et, enfin, sans accumulation de constituants dans la membrane, ce qui permet d'envisager un fonctionnement en continu donc sans cycle de régénération.

Les expériences de dialyse d'équilibre ont été réalisées à l'aide d'un dialyseur composé d'un appareil rotatif Dianorm (Fig. 102) contenant 5 macrocellules de 10 mL en téflon, un matériau extrêmement inerte, permettant une récupération maximale de l'échantillon (Fig. 103). Les deux compartiments de chaque cellule étant séparés par une membrane MWCO (Molecular weight cut-off) de Diachema (5000 Da). Deux milieux de libération sont utilisés, l'eau et la γ -valérolactone. Au début des expériences, chacun des deux milieux de libération a été injecté dans un compartiment (3 mL), et une solution de SLN AT00X 38 a été injectée dans l'autre compartiment (3 mL) (Fig. 104). Les cellules ont été maintenues sur un agitateur rotatif horizontal tournant à 8 rpm pendant 72 h. Les échantillons ont été ensuite analysés par HPLC pour déterminer la quantité d'actif libéré par la formulation (Tableau 36). L'acide benzoïque a été utilisé comme référence.

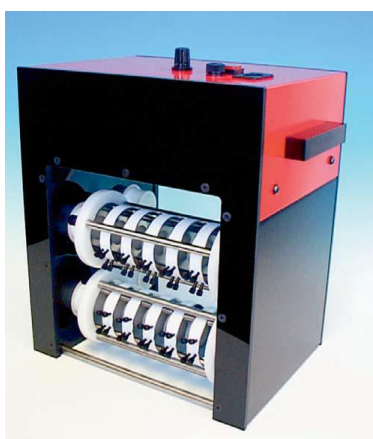


Fig. 102. Dialyseur Dianorm.

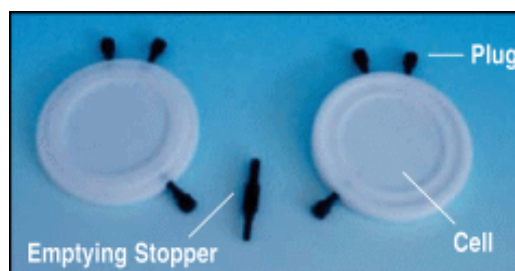


Fig. 103. Macrocellule en Teflon.

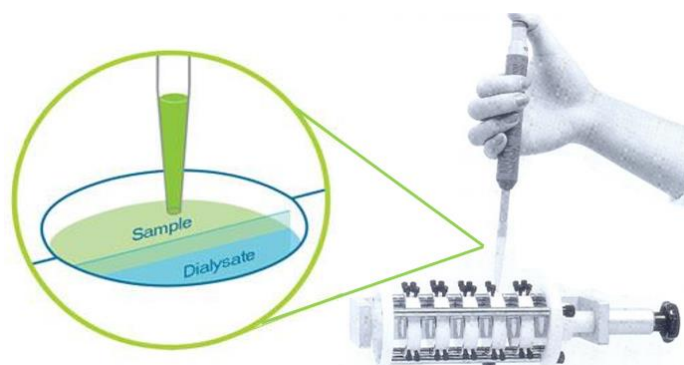


Fig. 104. Remplissage des deux compartiments de la cellule de dialyse.

Tableau 36. Taux de relargage d'actif des SLN.

Échantillons	Volume injecté (μL)	Aire du pic (μV*sec)	Taux de relargage (%)
Dialysat cellule 1 : eau + actif relargé	15	100227	26,31
Dialysat cellule 2 : γ-valérolactone + actif relargé	15	146598	38,9
Dialysat cellule 3 : γ-valérolactone + actif relargé dilué	15	84806	44,2

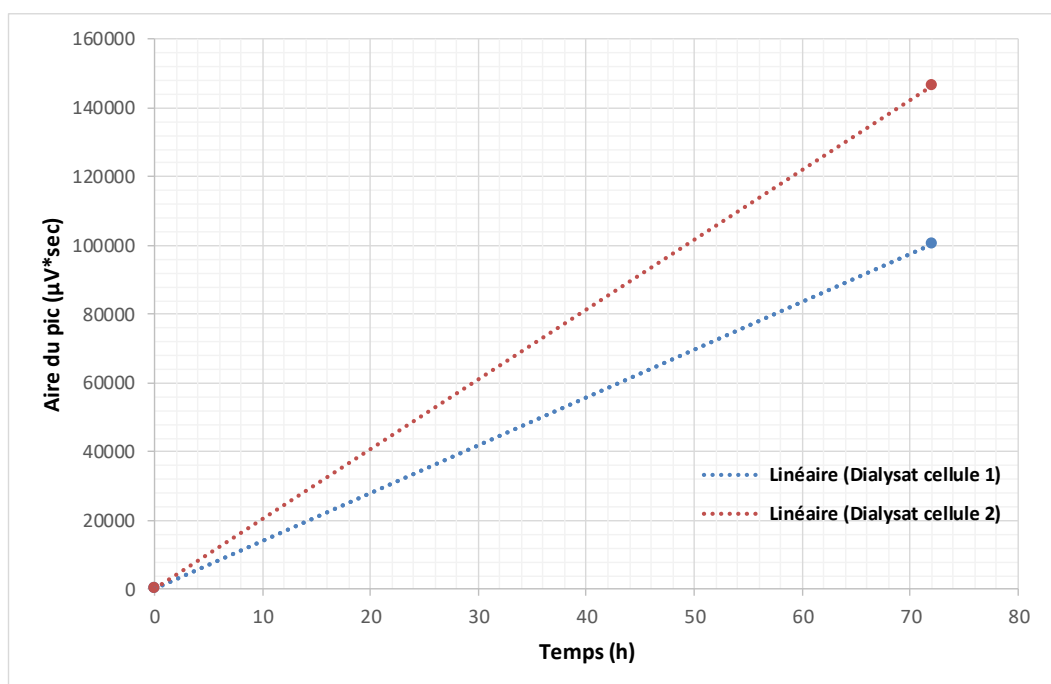


Fig. 105. Relargage de l'extrait encapsulé des cellules 1 et 2 après 72 h de dialyse.

La libération de l'extrait dans l'eau et dans la γ -valérolactone à partir des dispersions de nanoparticules a été calculée après 72 h de dialyse (Fig. 105). Compte tenu de la matrice de nanoparticules lipidiques et du milieu de libération aqueux, la libération du médicament est

très probablement une libération contrôlée par diffusion. La formulation optimale (SLN AT00X 38) testée a démontré une libération contrôlée de l'extrait avec un taux de relargage de 26,31 % et 38,9 % dans l'eau et la γ -valérolactone respectivement (Tableau 36). Pour une même quantité de SLN au départ, le relargage est plus rapide dans la γ -valérolactone indiquant la présence d'un équilibre thermodynamique plus prononcé qu'avec l'eau.

Dans cette expérience, l'effet de la dilution de la formulation sur la libération d'actif a été étudié (Dialysat cellule 3). La dispersion de SLN a été diluée au 1/2 fois avec de la γ -valérolactone puis une étude de libération a été réalisée dans un milieu de libération de 3 mL. Les résultats ont montré une amélioration considérable du taux de libération d'actif après dilution (38,9 % avant dilution et 44,2 % après dilution à 72 h). Par conséquent, les résultats mettent en évidence un effet significatif de la dilution sur la libération de l'actif à partir de la formulation et démontre que la γ -valérolactone joue le rôle de promoteur d'absorption de l'extrait.

7.7.6.1 Cinétique de libération

La même expérience a été réalisée dans le but d'étudier la cinétique du relargage de l'actif dans les SLN par rapport à l'actif seul afin de démontrer l'existence d'une libération prolongée avec les SLN. Dans un premier temps, 3 mL de la solution de SLN AT00X 38 ont été injectés dans un compartiment des 5 cellules, et dans l'autre compartiment 3 mL d'une solution de tampon phosphate à pH 7,4. La cinétique de libération a été étudiée en prélevant à des intervalles de temps précis le tampon phosphate (milieu de libération) et en dosant la quantité d'actif libéré en mesurant la quantité d'acide benzoïque après 1h, 2h, 3h, 6h et 24h (Tableau 37).

Tableau 37. Cinétique de libération d'actif avec et sans SLN.

Temps (h)	Aire du pic SLN ($\mu V \cdot sec$)	Cinétique SLN (%)	Aire du pic actif ($\mu V \cdot sec$)	Cinétique actif (%)
0	0	0	0	0
1	31578	8,31	122564	32,2
2	67940	17,8	274459	72,2
3	116411	30,6	302867	79,7
6	246449	64,8	326695	85,9
24	319827	84	343934	90,5

La figure 106 montre les profils de libération de l'actif en fonction du temps obtenus à partir d'échantillons fraîchement préparés, de solution de l'actif AT00X et de SLN chargés d'actif,

en appliquant le procédé de la membrane de dialyse. Une forte libération de l'actif AT00X en solution a été immédiatement observée au cours de la première heure (32,2 %).

En suivant la cinétique de libération de l'actif en solution, 79,7 % de l'actif est libéré pendant 3 h, tandis que dans le cas des SLN seulement 30,6 % de l'actif est libéré. Ceci est attribué à une libération prolongée par les mécanismes de diffusion passive combinée à une dégradation ou une dissolution de la matrice lipidique. La libération prolongée continue dans le cas des SLN pour atteindre 84 % après 24 h.

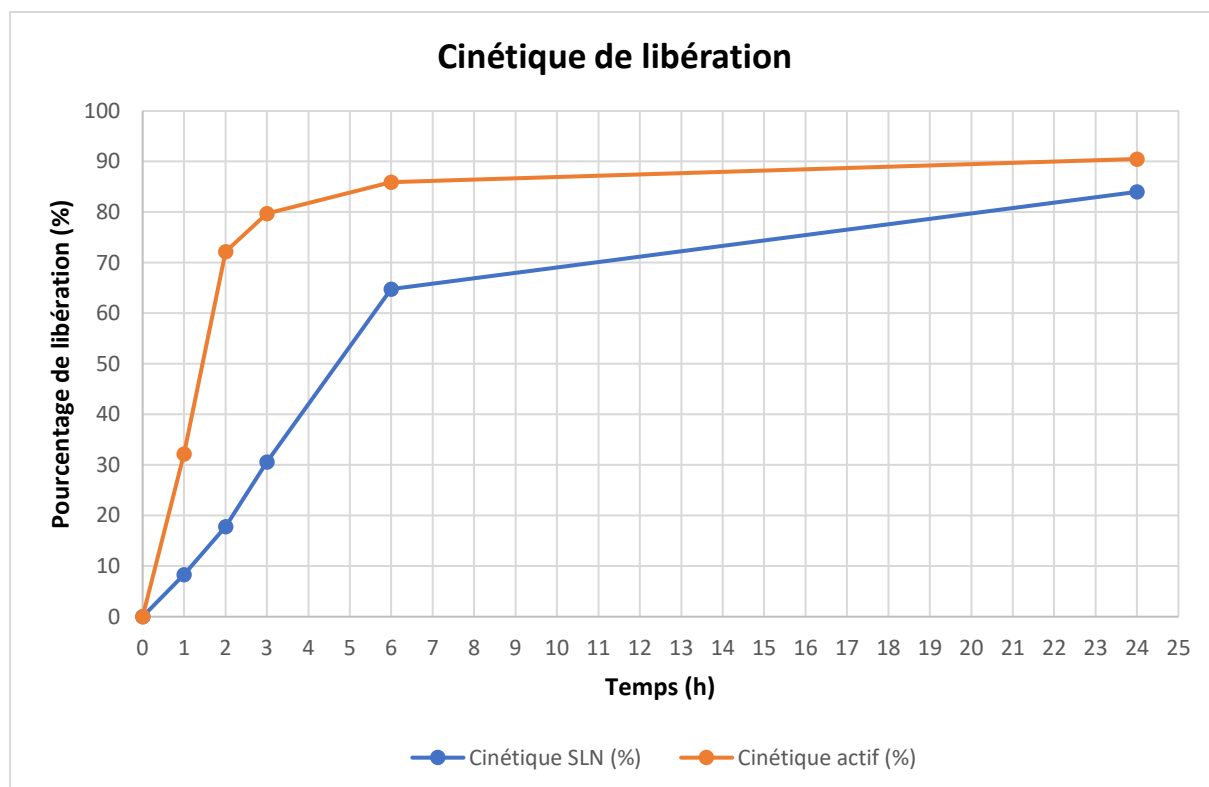


Fig. 106. Profil de libération de l'actif en fonction du temps des SLN.

Le profil de libération obtenu pour l'actif dans les SLN, est caractéristique d'une libération contrôlée due à l'utilisation de lipide solide (Compritol), qui permet de mieux maîtriser la libération de l'actif par sa mobilité réduite dans une phase solide.

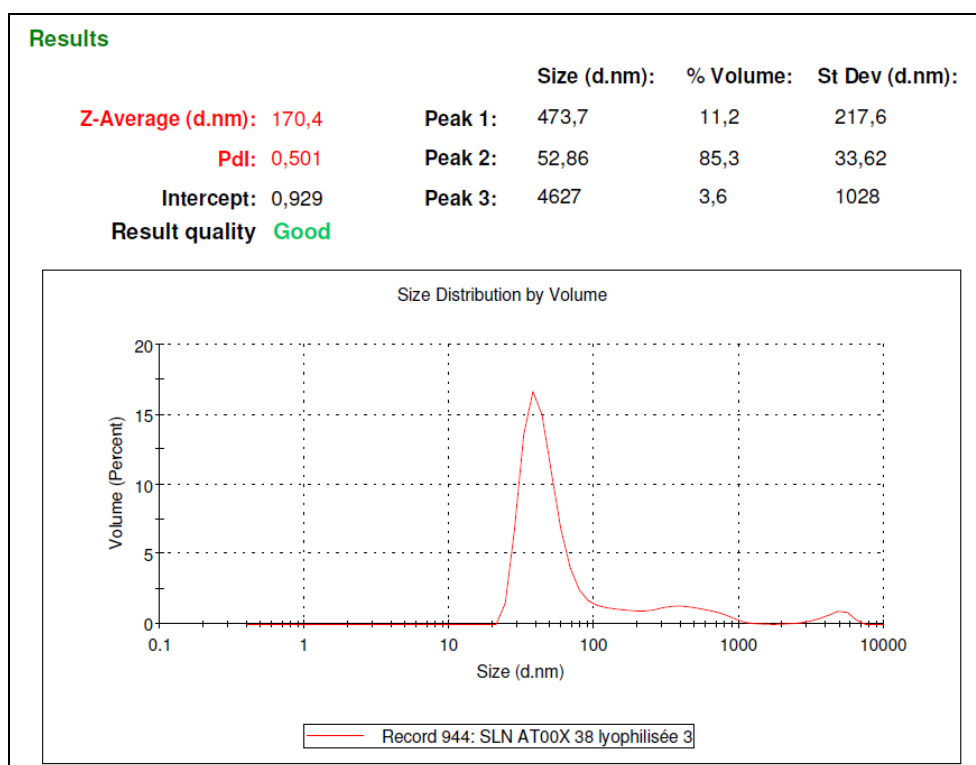
L'agitation mécanique lors de la formation des SLN, conduit à la formation de nanoparticules lipidiques avec une matrice homogène. Les gouttelettes cristallisent et il n'y a pas de séparation de phase entre l'actif et le lipide. Ce modèle est approprié pour avoir une libération prolongée de l'actif.

Ces résultats démontrent l'adéquation principale du SLN en tant que formulation à libération prolongée (Fig. 106).

7.7.7 Stabilité après lyophilisation

Au cours de cette étude, une lyophilisation des SLN a été faite afin de pouvoir vérifier leur stabilité et mieux les étudier sous forme sèche notamment pour la diffraction des rayons X, l'analyse calorimétrique différentielle à balayage et la caractérisation morphologique de ces dernières par Microscopie électronique à Balayage (MEB).

Les SLN ont été lyophilisés en utilisant un lyophilisateur « Christ Alpha 1-4 LSC ». 100 mL de la formulation optimale de SLN sont placés dans un flacon en verre de 500 mL et congelés à -30°C. Après la congélation, les échantillons sont lyophilisés selon un premier cycle de dessiccation primaire pendant 24 h et un deuxième cycle de dessiccation secondaire pendant 48 h à l'aide d'une pompe à vide suivie d'un condenseur à vapeur à une température de -55 °C et une pression de 0,045 mbar. Après lyophilisation, la formulation a été reconstituée dans de l'eau ultrapure. La taille, le potentiel zêta et le PDI ont été déterminés (Fig. 107).



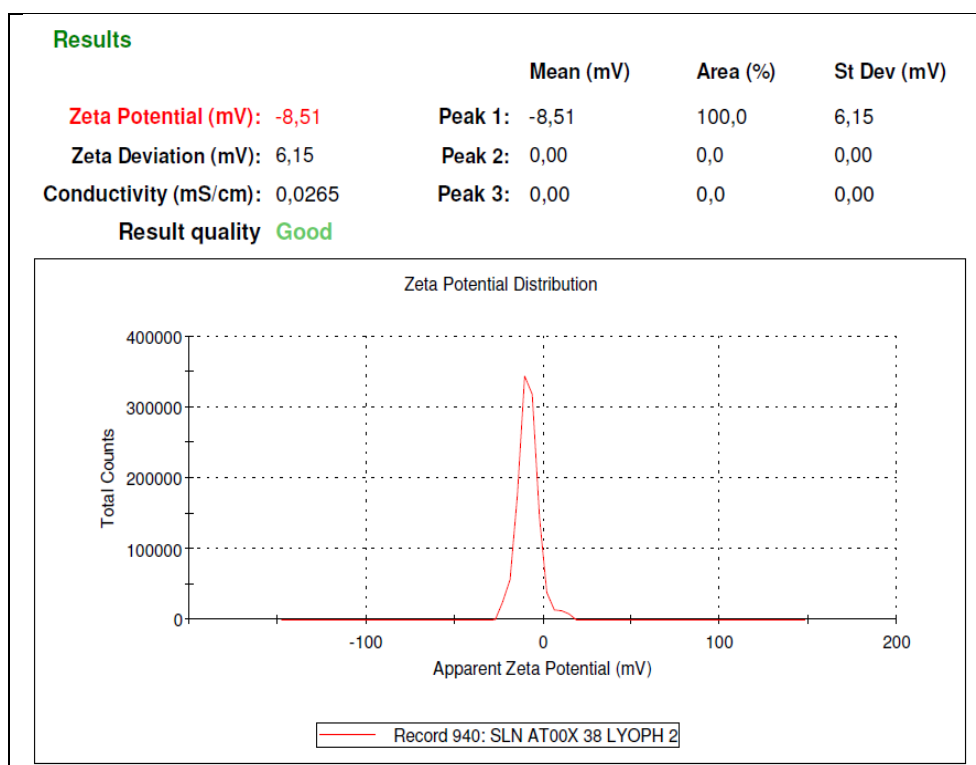


Fig. 107. Taille, potentiel zêta et PDI des SLN après lyophilisation.

Tableau 38. Taille, potentiel zêta et PDI avant et après lyophilisation.

Temps	Échantillon	Taille (nm)	Potentiel zêta (mV)	PDI
Avant lyophilisation	SLN AT00X 38	46,42	- 6,96	0,502
Après lyophilisation	SLN AT00X 38	52,86	- 8,51	0,501

Le processus de lyophilisation a été étudié pour évaluer les propriétés de reconstitution du SLN. Après reconstitution, les formulations doivent conserver leurs propriétés physico-chimiques. Le potentiel zêta et le PDI de la formulation SLN AT00X 38 lyophilisée n'ont pas subi une variation remarquable (Tableau 38). La dispersion de SLN lyophilisée a révélé une légère augmentation de la taille, suggérant une tendance des nanoparticules à s'agglomérer. Par conséquent, les SLN ont été stabilisées en utilisant du Lutrol F68 qui a permis de contrôler la croissance des particules. Cet effet stabilisateur du Lutrol F68 est lié à la déshydratation du surfactant présent dans la solution qui le contraint à la surface des particules, produisant un effet cryoprotecteur (Quintanar-Guerrero et al., 1998). La présence de Lutrol F68 empêche l'agrégation des nanoparticules et favorise leur dispersion lorsque des nanoparticules lyophilisées sont mises en suspension dans l'eau. La formulation développée dans le présent travail a démontré des propriétés adéquates pour le stockage sous forme lyophilisée.

7.8 Analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC)

La calorimétrie différentielle à balayage ou « *Differential Scanning Calorimetry* » (DSC) est une technique d'analyse thermique utilisée pour déterminer la différence de flux thermiques entre l'échantillon testé et une référence, sur une plage de température contrôlée. Cette procédure analytique est réalisée dans un système fermé, isolé des environs par une limite, à travers lequel seules la chaleur et l'énergie, mais pas la masse, peuvent circuler. Elle permet de déterminer les températures de transitions de phase d'un composé chimique à étudier. L'échantillon de référence doit avoir une capacité calorifique bien définie sur la gamme des températures à analyser. Bien souvent la référence est représentée par de l'air (creuset vide). La quantité de chaleur à déterminer pour l'échantillon dépend de la nature du procédé qu'il soit exothermique (fournissant de la chaleur) ou endothermique (absorbant de la chaleur). Par conséquent, la DSC permet de déterminer :

- Au chauffage, les températures de fusion, d'oxydation ou de décomposition
- Au refroidissement, la température de cristallisation, le phénomène de polymorphisme et pseudo-polymorphisme.

Les principaux pics caractéristiques que l'on peut rencontrer lors d'une analyse par DSC sont (Fig. 108) :

- *Pic de la température de transition vitreuse* : c'est un phénomène endothermique, qui traduit le passage de l'état solide (vitreux) à l'état caoutchouteux.
- *Pic de la température de cristallisation* : c'est un phénomène exothermique, qui traduit le passage de l'état liquide à l'état solide.
- *Pic de la température de fusion* : c'est un phénomène endothermique qui traduit le passage de l'état solide à l'état liquide.
- *Pic de la température de polymérisation* : c'est un phénomène exothermique, qui traduit la plage de température à laquelle un composé peut se polymériser.

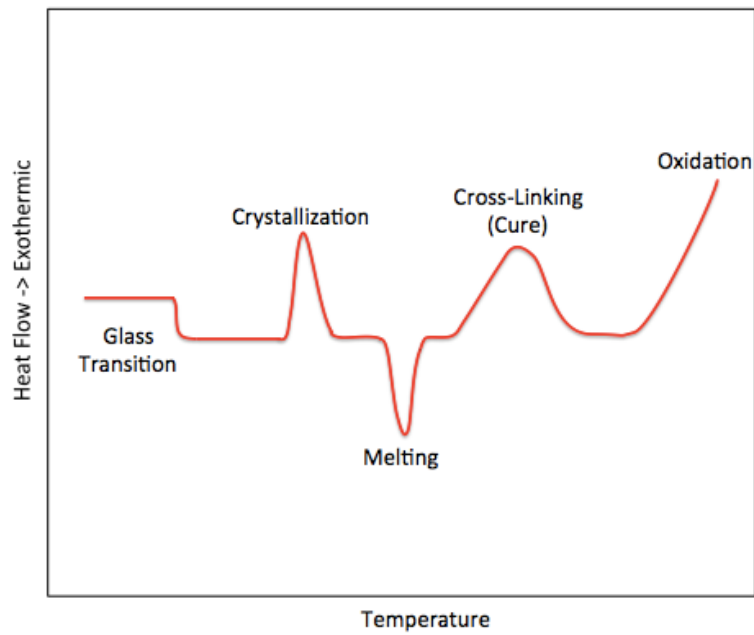


Fig. 108. Schéma d'une courbe de DSC montrant les formes associées à des transitions de phase.

La DSC est souvent utilisée pour obtenir des informations sur les propriétés et la composition de matériaux inconnus, étudier la pureté des échantillons et confirmer l'analyse de la composition. Elle est également très populaire dans les industries agroalimentaires et pharmaceutiques pour caractériser et permettre l'affinement de certaines propriétés physicochimiques comme la stabilité des macromolécules.

Une étape de préformulation analysée par DSC est nécessaire, pour mettre en évidence les interactions et incompatibilités entre les différents composants d'une forme galénique. Toutes modifications des pics spécifiques traduisent une modification de la molécule (Fig. 109).

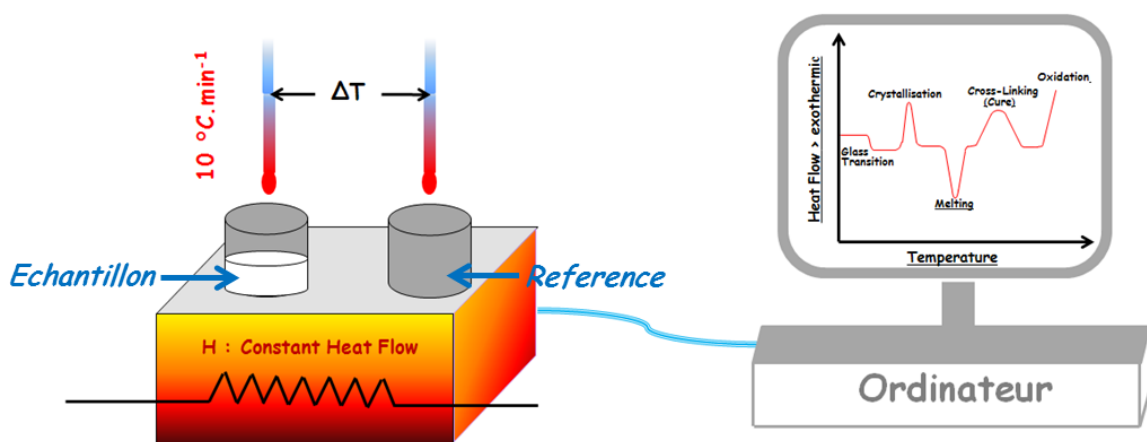


Fig. 109. Schéma du principe de la DSC.

Avant l'analyse par DSC, les échantillons de SLN ont été lyophilisés. Le lipide (Compritol), l'actif (AT00X), les SLN chargés d'actif, ont été analysés à l'aide d'une calorimétrie différentielle à balayage (DSC SETARAM 131). Les échantillons (10 mg) scellés dans des récipients en aluminium sous atmosphère d'azote à un débit de 20 mL/min ont été évalués dans des plages de température à 30°C-150°C, à une vitesse de 10°C/min. Les thermogrammes des échantillons ont été enregistrés et présentés dans la Fig. 110.

L'analyse thermique a été effectuée à l'aide d'une calorimétrie différentielle à balayage (DSC SETARAM 131). La vitesse de chauffage est de 10 °C/min allant de 25 °C jusqu'à 150 °C sous une atmosphère azotée. Des échantillons de 10 mg sont placés dans des creusets en aluminium scellés à l'aide de la presse fournie afin d'éviter toute fuite dans le compartiment DSC. L'échantillon est ensuite placé dans la cellule de DSC et de l'azote est mis sous tension. L'expérience est conçue sur l'ordinateur et une fois que le test est effectué complètement, le graphique de DSC est ouvert dans le logiciel d'analyse de DSC où l'on peut intégrer les pics afin de calculer l'enthalpie de fusion et de cristallisation.

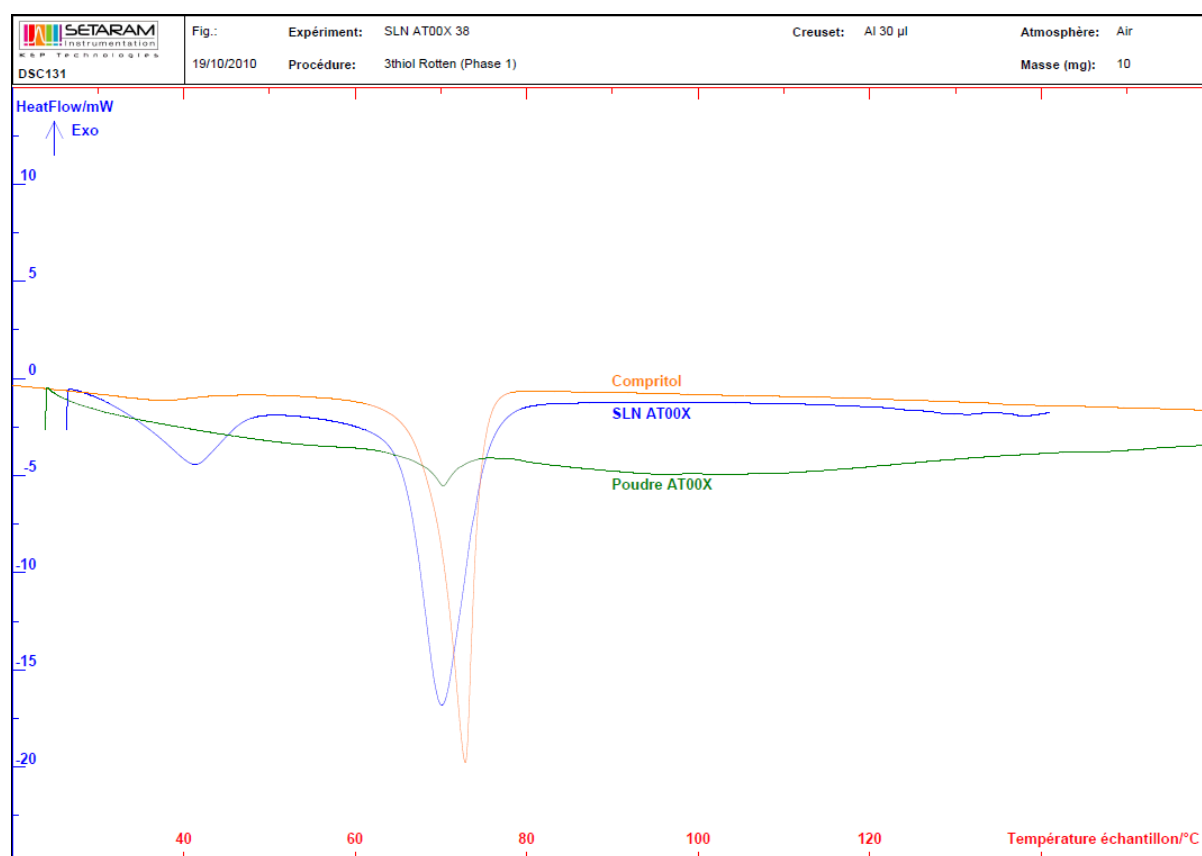


Fig. 110. Résultat de l'analyse par DSC de l'actif AT00X, du corps gras Compritol et des SLN AT00X 38.

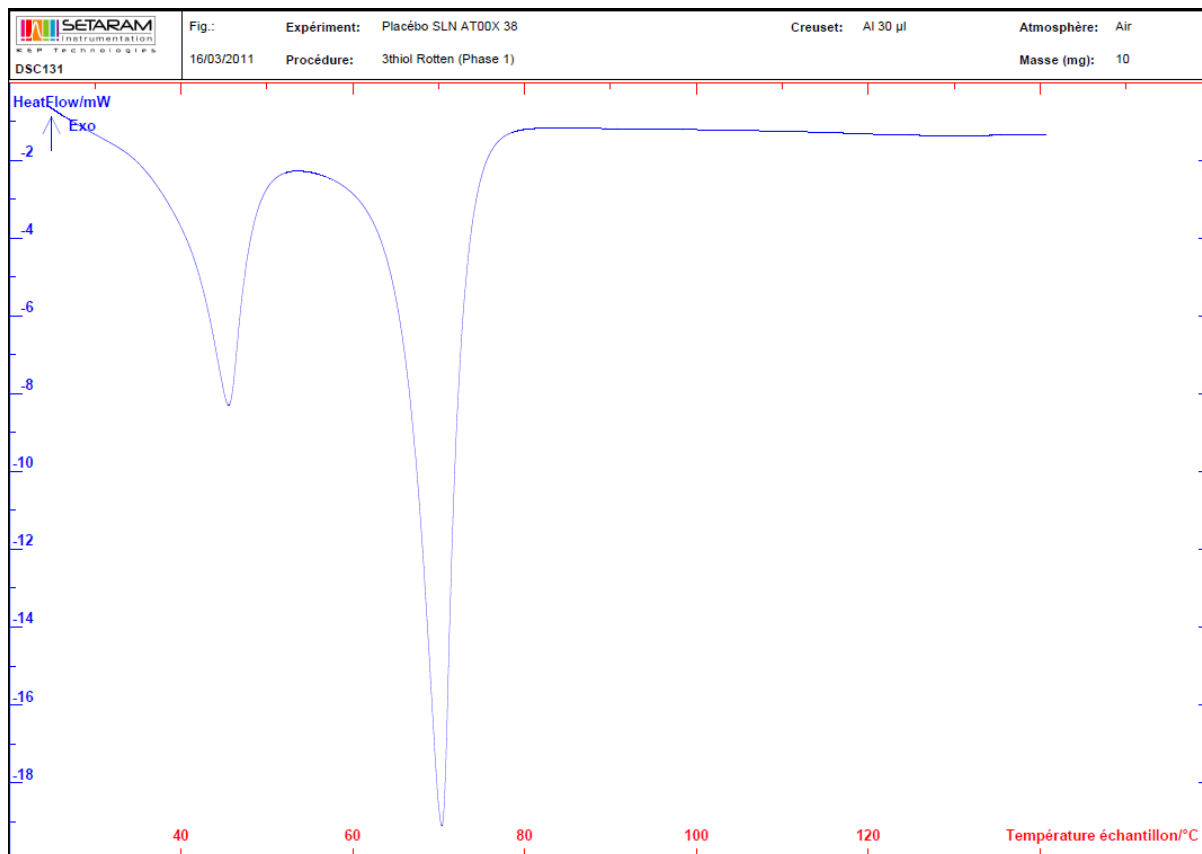


Fig. 111. Résultat de l'analyse par DSC des SLN AT00X 38 placébo.

La DSC a été réalisée pour évaluer les interactions de l'actif et la cristallinité des matrices lipidiques, cet aspect pouvant influencer la libération *in vitro* et *in vivo* du composé des systèmes. La cristallisation des lipides est un point important pour la performance des SLN. En fait, des cristaux moins parfaits avec de nombreuses imperfections peuvent offrir un espace pour accueillir le médicament (Müller et al., 2000) et peuvent également moduler la mobilité du médicament pendant le processus de libération (Mehnert and Mäder, 2001, 2012; Silva et al., 2011). L'absence de cristallinité parfaite est également indispensable pour éviter l'expulsion du médicament pendant le stockage.

Les échantillons suivants ont été analysés : AT00X, Compritol, SLN AT00X 38, SLN placébo (sans actif). La figure 110 décrit les thermogrammes DSC obtenus. Le petit pic net à 70 °C ainsi qu'un large pic dans la plage de température (80 °C-120 °C) correspondent à la fusion de l'actif AT00X, sont absents du thermogramme des SLN chargées d'actif AT00X. Cela semblerait indiquer soit une solubilisation complète de l'actif dans la matrice lipidique, soit la transformation des cristaux de l'actif en une forme amorphe qui a été dispersée dans la matrice lipidique. Le pic endothermique du Compritol (74 °C) est passé à (70 °C) dans les SLN AT00X. Ce changement pourrait être dû à la transformation des lipides en une forme de

nanoparticule contenant un surfactant, ainsi qu'à la présence d'actif (SLN chargés d'AT00X). La diminution de l'intensité du pic indiquent probablement une réduction de la cristallinité de la matrice lipidique dans les SLN. Dans les thermogrammes DSC des SLN chargées, un petit pic endothermique a été observé à 40 °C. Ce pic indique la présence du Lutrol soit sous forme de revêtement entourant les nanoparticules, soit sous forme de résidu après lyophilisation (Fig. 111). Il serait judicieux de pouvoir investiguer l'état de cristallinité de notre actif au sein des SLN par des techniques de diffraction des rayons X telle que le SAXS (*Small-angle X-ray Scattering*).

7.9 Caractérisation des SLN par microscopie électronique à balayage

Les clichés de microscopie électronique à balayage ont été obtenus à l'aide d'un microscope électronique à balayage ZEISS de haute résolution, modèle Gemini 500.

7.9.1 Phase liquide diluée (1/20)

Les images obtenues de la phase liquide diluée de l'échantillon SLN AT00X 38 sont présentées dans la Fig. 112. Elles mettent en évidence une matrice dans laquelle sont dispersés des objets de géométrie majoritairement sphérique. La dispersion de ces objets dans la matrice est homogène en forme et en taille avec une dimension minimale de l'ordre de 40-50 nm.

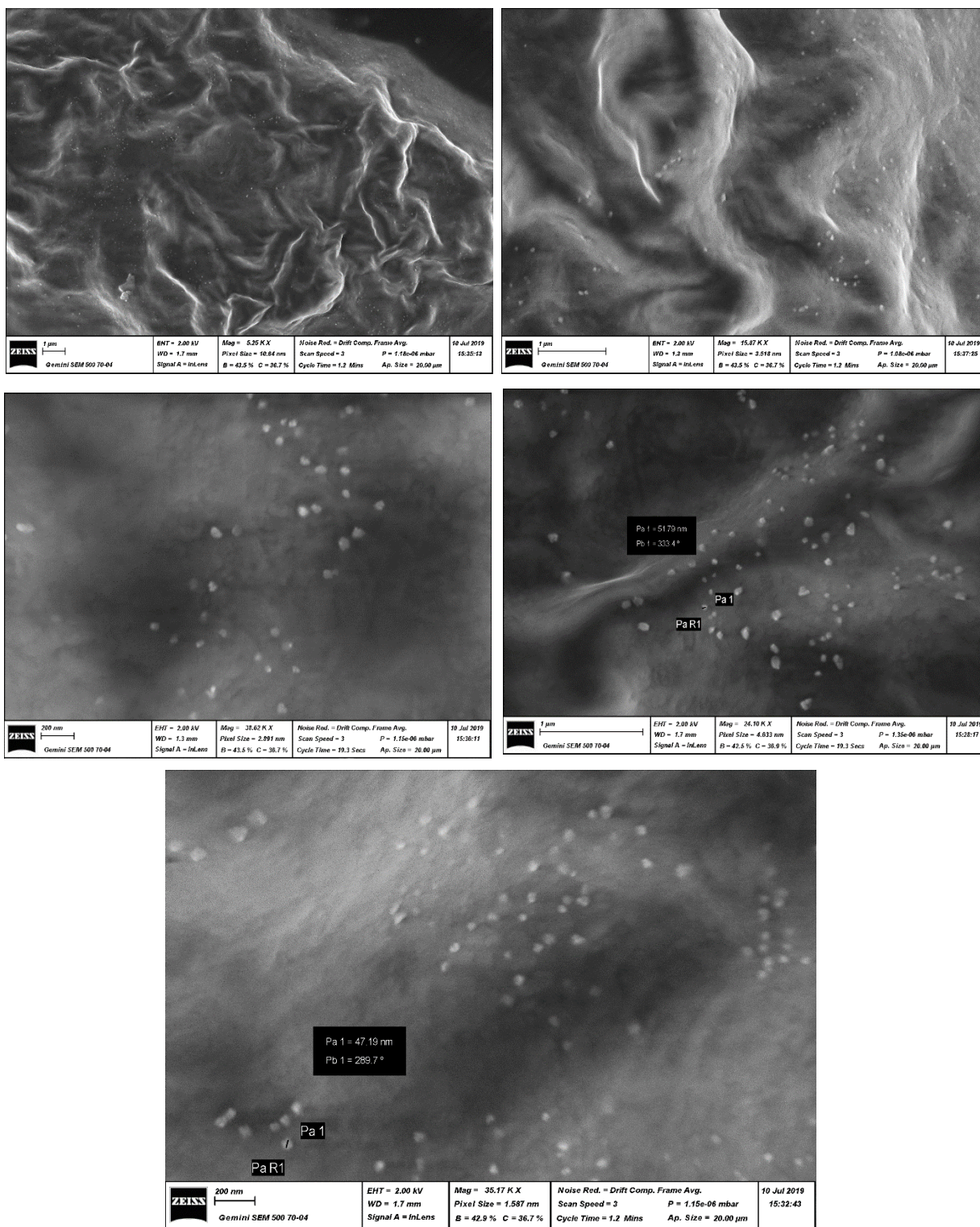


Fig. 112. Images MEB obtenues pour la phase liquide diluée de la formulation SLN AT00X 38.

Les résultats obtenus par microscopie électronique sur la phase liquide diluée sont également en accord avec ceux obtenus par diffusion dynamique de la lumière, même si le facteur de dilution utilisé pour les deux expériences n'est pas le même : la présence d'objets de taille nanométrique (< 100 nm) est mise en évidence. Pour l'échantillon SLN AT00X 38, la taille de ces objets est comprise entre 40 et 55 nm.

Conclusion

- Les SLN constituent l'un des meilleurs systèmes colloïdaux de véhicule d'actifs à travers les barrières biologiques
- La technique d'ultrasonication permet un screening rapide des différentes formulations de la matrice d'expériences
- L'optimisation a permis d'obtenir une formulation optimale (SLN AT00X 38) au niveau de la taille, du potentiel zêta et du PDI
- La caractérisation de la formulation optimale valide l'étude ainsi que le modèle d'optimisation expérimental :
 - o Taille (< 200 nm), potentiel zêta (- 6 mV), PDI (entre 0,08 - 0,7)
 - o Stabilité physico-chimique et absence de phénomène de déstabilisation
 - o Efficacité d'encapsulation de 79,36% indiquant une solubilité de l'extrait avec le Compritol. De façon corrélée avec la littérature, la nature chimique du Compritol permet la formation de complexes de cristaux avec l'actif, permettant une meilleure fixation de l'actif
 - o Une libération prolongée de l'actif a été mise en évidence grâce aux SLN
 - o Stabilité des SLN après lyophilisation favorisant leur conservation sous forme sèche
 - o L'étude calorimétrique des SLN à l'aide de la DSC a mise en évidence un polymorphisme du Compritol nécessaire pour la libération prolongée
 - o L'analyse par microscopie électronique à balayage (MEB) a montré que les SLN étaient de forme sphérique avec une taille d'environ 40 - 50 nm, ce qui correspond à la taille des SLN mesurée par diffusion dynamique de la lumière

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

Ces dernières années, le problème de la délivrance de médicaments au cerveau a fait l'objet de nombreuses recherches en raison de la propagation de maladies neurodégénératives (Begley, 2004; Neuwelt et al., 2008; Pardridge, 2002). En fait, le vieillissement de la population et l'accroissement des facteurs de risque ont considérablement favorisé l'incidence de pathologies telles que la maladie d'Alzheimer (Mathers et al., 2008). Bien que les structures cérébrales aient été étudiées, leur homéostasie complexe reste en grande partie inconnue, ce qui a limité la compréhension de la physiopathologie et de l'étiologie des troubles du système nerveux central (SNC).

La croissance étonnante des médicaments pour le SNC sur le marché au cours des dernières années a généré d'énormes efforts de recherche pour tenter de développer de nouveaux médicaments pour la maladie d'Alzheimer. Cependant, le principal intérêt a été mis sur la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques plutôt que sur le développement de nouvelles approches et systèmes pour cibler les actifs vers le cerveau. C'est une tendance générale en science pharmaceutique.

Un problème fondamental dans le développement de médicaments pour la maladie d'Alzheimer est que la plupart des molécules sont incapables de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) ou n'atteignent pas le cerveau à des concentrations thérapeutiques (Neuwelt, 1989; Pardridge et al., 2002). Il existe par conséquent un fort besoin d'approches alternatives pour surmonter le problème de la BHE et, parmi les différentes stratégies proposées au fil des années, les systèmes de vectorisation colloïdaux semblent très prometteurs comme le confirme les premiers tests KRL effectués avec les SLN qui semblent démontrer une augmentation de l'activité 20 fois supérieure à celle de l'actif seul.

Le faible nombre de molécules commercialisées et enregistrées (moins de 1%) reflète la complexité du développement de médicaments du système nerveux central, certainement en partie à cause de la présence de la BHE. Il est clair que cet échec est imputable à une conception erronée des programmes de découverte et de développement de médicaments, qui néglige la contribution fondamentale d'un programme d'administration de médicaments bien soutenu.

Parmi les nombreuses stratégies tentées pour surmonter ce problème, les nanovecteurs bien adaptés peuvent avoir un grand potentiel. Les nombreuses preuves relatives à l'administration de médicaments dans le cerveau au moyen de nanoparticules ne peuvent être ignorées ni considérées comme des preuves uniques, même si son mécanisme d'action n'est pas complètement compris. Les nanoparticules lipidiques solides (SLN) peuvent en fait être des porteurs prometteurs puisque leur prévalence sur d'autres formulations en termes de toxicité, de faisabilité de la production et d'évolutivité est largement documentée dans la littérature.

Dans cette étude, nous avons travaillé sur deux axes complémentaires innovants : le développement d'une nouvelle approche non-médicamenteuse basée sur un extrait de plantes agissant en synergie et le développement d'une stratégie galénique innovante consistant sur des nanoparticules lipidiques solides adaptées à cet extrait de plantes afin de le vectoriser convenablement vers sa cible.

Premier axe : consistait à développer une nouvelle formulation végétale brevetable qui s'appuie sur l'effet synergique et potentialisant des plantes médicinales Chinoises. 4 versions de l'extrait désignées par : AT000, AT00X, AT33X et AT33B ont été étudiées par rapport à leur activités antioxydante, anti-inflammatoire, anticytotoxique et neuroprotectrice. Une étape d'optimisation basée sur des plans d'expériences, était cruciale pour obtenir la formulation brevetable AT33B avec des effets thérapeutiques optimaux.

Deuxième axe : avait pour but la conception d'une stratégie galénique innovante applicable à la formulation AT33B. cette stratégie consistait dans un premier temps à former des nanoparticules lipidiques solides (SLN) produites à partir de corps gras avec une température de fusion supérieure à 37 °C. Les SLN contenant l'extrait végétal, sont destinées à administrer l'actif au cerveau. Ensuite, une optimisation de la formulation des SLN selon la taille, le potentiel zêta et l'indice de polydispersité, a permis d'obtenir des SLN ayant de meilleures propriétés de taille, de stabilité et de cinétique de relargage assurant une meilleure vectorisation de l'actif vers sa cible. La caractérisation des SLN optimisées a mis en évidence la fiabilité de l'étude de l'optimisation.

Il est clair que les domaines pharmaceutique et médical bénéficieront de ces nouvelles technologies, les nanoparticules sous leurs différentes formes (dendrimères, liposomes, SLN) étant particulièrement impliquées dans la délivrance et le ciblage de médicaments et, par

conséquent, jouent un rôle majeur dans l'administration de d'actifs par le cerveau. Il devient de plus en plus évident que les SLN auront un impact important sur les progrès de la délivrance de médicaments et, en particulier, du ciblage des médicaments dans le cerveau.

Si le potentiel majeur des SLN en matière d'administration de médicaments pour le cerveau, devrait accélérer le processus par lequel les résultats des recherches effectuées en laboratoire seront directement utilisés pour développer de nouvelles méthodes de traitement des patients ; cet objectif ne peut évidemment être atteint qu'en établissant la sécurité et l'efficacité des formulations à base de SLN pour le cerveau. Des études *in vivo*/ *in vitro* approfondies doivent être également effectuées pour démontrer l'augmentation de la biodisponibilité ainsi que l'acheminement de l'actif tout en gardant sa stabilité vers le cerveau assurés par les SLN.

Par conséquent, l'utilisation de ces transporteurs devrait faire l'objet d'une étude plus approfondie en tant que système d'administration de médicaments cérébraux. En outre, une stratégie optimale de développement de médicaments du système nerveux central devrait envisager la conception de supports appropriés pour ces médicaments dès qu'il est démontré qu'ils sont actifs mais qu'ils ne peuvent pas atteindre leur cible moléculaire. Cela permettrait de trouver le support approprié, en fonction des caractéristiques de la molécule, pour une évaluation préclinique et clinique précoce de la formulation finale. Une telle approche améliorerait certainement les stratégies de développement de médicaments en augmentant le nombre de traitements jusqu'ici non exploités mais qui pourraient effectivement atteindre le marché.

ANNEXE 1

COSTUS

Saussurea costus Lipsch (*Saussurea lappa* Decne. Sch. Bip.)

RÉGLEMENTATIONS

Textes législatifs

Pays	Décision	Parties de plantes	CA/DA	Substances à surveiller	Restrictions	Commentaire
Belgique (<u>Liste plantes et champignons - arrêté royal - BE - RM</u>)	<input checked="" type="checkbox"/>	racine	CA	/	/	
Belgique (<u>Liste plantes et champignons - arrêté royal - BE - RM</u>)	<input checked="" type="checkbox"/>	/	DA	/	/	Saussurea spp.
France (<u>Liste plantes - arrêté plantes - FR - RM</u>)	<input checked="" type="checkbox"/>	cône, racine	CA	lignanes, chalcones, lactones sesquiterpéniques	/	
Italie (<u>Liste plantes 1 bis Belfrit - IT - RM</u>)	<input checked="" type="checkbox"/>	racine	CA	/	/	
Roumanie (<u>Liste plantes - ROU - RM</u>)	<input checked="" type="checkbox"/>	plante	DA	/	/	Saussurea spp.
Slovénie (<u>Liste plantes - SLO - RM</u>)	<input checked="" type="checkbox"/>	plante	DA	/	/	

sur 3

11/10/2017 à 11:36

France (<u>Liste B de la Pharmacopée</u>)	<input checked="" type="checkbox"/>	racine		En vertu du décret n° 2008-839, les compléments alimentaires contenant des plantes de la liste B ne peuvent pas être vendus par des personnes autres que des pharmaciens.		
France (<u>Liste des plantes éligibles à l'article 15</u>)	<input checked="" type="checkbox"/>	racine				
Islande (<u>Liste plantes et substances - ISL</u>)	<input checked="" type="checkbox"/>	plante		peut être requalifié en médicament en Islande		
Norvège (<u>Liste plantes - NOR</u>)	<input checked="" type="checkbox"/>	plante				

Expertise réglementaire

Article 15

Commentaire

Plante en liste B de la Ph. Fr. dont la déclaration serait refusée par la DGCCRF

NOVEL FOODS

Textes

<i>Libellé</i>	<i>Commentaire</i>
<u>Avis Belgique SPF</u>	Racine non Novel Food dans les compléments alimentaires

MÉDICAMENTS

Textes réglementaires

<i>Libellé</i>	<i>Commentaire</i>
<u>Liste plantes et substances - ISL</u>	peut être requalifié en médicament en Islande

SÉCURITÉ

Textes

<i>Libellé</i>	<i>Commentaire</i>
<u>Compendium EFSA</u>	Saussurea spp.

Textes réglementaires

<i>Libellé</i>	<i>Commentaire</i>
<u>Liste B de la Pharmacopée</u>	En vertu du décret n° 2008-839, les compléments alimentaires contenant des plantes de la liste B ne peuvent pas être vendus par des personnes autres que des pharmaciens.

Contre-indications / Interactions / Informations sur la toxicité

Néant

ACTUALITÉS

- o Les plantes listées dans la liste B de la pharmacopée ne seraient pas déclarables dans les compléments alimentaires en France (05/12/2014)

ANNEXE 2



Base de données scientifique et réglementaire
pour vos projets en nutrition santé



Axes d'allégations

- Fonction hépatique
- Antioxydant
- Fonction cognitive
- Anti-stress

Pays

Textes législatifs : France, Belgique, Italie, Croatie

Textes non législatifs : Islande, Norvège, France

Informations Novel Food

- Novel Food sauf dans compléments alimentaires
- Toutes parties non Novel Food dans les compléments alimentaires

BACOPA

Bacopa monnieri (L.) Wettst.

RÉGLEMENTATIONS

Textes législatifs

Pays	Décision	Parties de plantes	CA/DA	Substances à surveiller	Restrictions	Commentaire
Belgique (Liste plantes et champignons - arrêté royal - BE - RM)	<input checked="" type="checkbox"/>	plante entière	CA	/	/	
Croatie (Liste plantes et substances - CR - RM)	<input checked="" type="checkbox"/>	toutes parties	CA	/	L'étiquetage doit comporter l'avertissement : Les personnes prenant des médicaments doivent demander conseil auprès d'un médecin avant la prise. Non recommandé pour les maladies de la thyroïde, l'asthme, l'emphysème, des troubles digestifs et	

ANNEXE 3 : TRAVAUX COLLABORATIFS SUR DES EXTRAITS BIOACTIFS

Article 1 : revue de littérature

Senankpon Martial Gnansounou, Samy Iskandar, Maxime Robin, Jean-Michel Brunel, Edwige Dahouenon and Philippe Piccerelle. *Dialium guineense* Willd. *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. Ex Benth. And *Tamarindus indica* L.: Review of known and synergetic bioactive compounds. Journal of Medicinal Plants Studies 2018 ; 6(3) : 103-111.

L'humanité est tributaire des végétaux à maintes égards. Ainsi, pour se soigner et se nourrir par exemple, elle puise dans la végétation. La phytothérapie est donc universelle et très ancienne. Toutefois, la connaissance des molécules bioactives issues des plantes est récente. Elle fut rendue possible grâce, entre autres, aux avancées de la chimie et de la microbiologie. Les firmes pharmaceutiques, se basant sur ces outils devenus très performants, ont réussi à isoler ou synthétiser des principes actifs. Toutefois, le coût de ces derniers les rend inaccessibles pour une grande partie de la population mondiale. La médecine traditionnelle (notamment la phytothérapie) demeure alors le premier recours dans les pays en voie de développement. C'est le cas au Bénin où les feuilles et écorces de *Dialium guineense*, *Parkia biglobosa* et *Tamarindus indica* (trois Fabacées) sont très utilisées comme remède contre les infections et leurs symptômes (inflammation, fièvre etc.). L'objectif de cette revue est de faire une description botanique des trois plantes, de présenter leur intérêt pharmacologique et de faire un inventaire de leurs molécules actives connues.

La plupart des publications recensées rapporte une activité antimicrobienne d'extraits de *Dialium guineense* Willd. Cependant, aucune molécule n'est identifiée comme responsable de cette activité. L'antraquinone trouvée dans l'extrait d'écorces est capable de former un complexe irréversible avec les acides alpha aminés nucléophiles conduisant à une inactivation des protéines enzymatiques contenant ces acides aminés. Les auteurs supposent que cette propriété est responsable de l'activité antimicrobienne. D'autres travaux lient l'activité antimicrobienne à la présence, de flavonoïdes, de tanins et de saponines. La nature exacte des composés actifs reste néanmoins inconnue. Enfin, deux composés ont été clairement identifiés

chez cette plante mais leur action est hors du champ antimicrobien. Ainsi, le précocène I est insecticide et la glycoprotéine appelée DigL a été mise en évidence pour son effet d'hémagglutination.

Les molécules (lupéol et catéchine) identifiées à partir d'extraits de *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. Ex Benth n'ont aucun rapport avec les propriétés antimicrobiennes rapportées. Le lupéol isolé des feuilles stimulerait la fonction des cellules β et augmenterait la sécrétion d'insuline en inhibant l' α -glucosidase et l' α -amylase. En ce qui concerne la catéchine également isolée des feuilles, cette molécule est supposée être impliquée dans des mécanismes susceptibles d'augmenter les teneurs en thiol cellulaire dans des conditions de stress oxydant.

La bibliographie révèle que peu de molécules ont été décrites chez *Tamarindus indica* L. L'alpha-tocophérol a été isolé à partir d'extrait éthanoliques des graines. C'est un antioxydant bien connu sous le nom de vitamine E. Une protéine isolée de cette plante a été identifiée comme étant inhibiteur de protéase de type Kunitz. La troisième molécule rapportée de *Tamarindus indica* L. est le tamarindienal ou (3E) -2,5-dioxo-3-hexéanal. C'est elle qui donne le goût amer des fruits du tamarin. Aucune activité biologique intéressante ne lui est attribuée.

Malgré la multitude de travaux mettant en évidence leurs activités pharmacologiques, peu de molécules actives ont donc été décrites. Ce manque de connaissances sur les composés bioactifs des trois plantes ne permet pas une analyse objective de leur utilisation contre les maladies infectieuses par les guérisseurs traditionnels du Bénin. Nous pensons alors qu'il serait intéressant de tester leurs extraits, de sélectionner les plus efficaces pour essayer d'en déterminer la composition.



ISSN (E): 2320-3862
ISSN (P): 2394-0530
NAAS Rating: 3.53
JMPS 2018; 6(3): 103-111
© 2018 JMPS
Received: 17-03-2018
Accepted: 20-04-2018

Senankpon Martial Gnansounou
(a) Laboratoire de Pharmacie Galénique,
Pharmacotechnie Industrielle,
Biopharmacie et Cosmétique, Faculté de
Pharmacie, Aix Marseille Université, 27
Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille,
France
(b) Laboratoire d'Etude et de Recherche
en Chimie Appliquée, Ecole
Polytechnique d'Abomey Calavi,
Université d'Abomey Calavi, Bénin

Samy Iskandar
Laboratoire de Pharmacie Galénique,
Pharmacotechnie Industrielle,
Biopharmacie et Cosmétique, Faculté de
Pharmacie, Aix Marseille Université, 27
Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille,
France

Maxime Robin
Laboratoire de Pharmacie Galénique,
Pharmacotechnie Industrielle,
Biopharmacie et Cosmétique, Faculté de
Pharmacie, Aix Marseille Université, 27
Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille,
France

Jean-Michel Brunel
Laboratoire de Biologie Structurale et
Chimie Biologie Intégrée, Centre de
Recherche en Cancérologie de Marseille -
Institut Paoli-Calmette, Marseille,
France

Edwige Dahouenon
Laboratoire d'Etude et de Recherche en
Chimie Appliquée, Ecole Polytechnique
d'Abomey Calavi, Université d'Abomey
Calavi, Bénin

Philippe Piccerelle
Laboratoire de Pharmacie Galénique,
Pharmacotechnie Industrielle,
Biopharmacie et Cosmétique, Faculté de
Pharmacie, Aix Marseille Université, 27
Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille,
France

Correspondence

Senankpon Martial Gnansounou
(a) Laboratoire de Pharmacie Galénique,
Pharmacotechnie Industrielle,
Biopharmacie et Cosmétique, Faculté de
Pharmacie, Aix Marseille Université, 27
Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille,
France
(b) Laboratoire d'Etude et de Recherche
en Chimie Appliquée, Ecole
Polytechnique d'Abomey Calavi,
université d'Abomey Calavi, Bénin

Dialium guineense Willd. *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. Ex Benth. and *Tamarindus indica* L.: Review of known and synergetic bioactive compounds

Senankpon Martial Gnansounou, Samy Iskandar, Maxime Robin, Jean-Michel Brunel, Edwige Dahouenon, Philippe Piccerelle

Abstract

Native from Africa, *Dialium guineense* Willd. *Parkia biglobosa* R. Br. Ex Benth. And *Tamarindus indica* L. grow in tropical regions, and are very widespread in West Africa, particularly in Benin. They are simultaneously used in the traditional healing of infectious diseases but there is a lack on their bioactive compounds description. This work places a special emphasis on inventory of known bioactives compounds from the three plants and their mechanism of action in order to identify the need for further research. It emerges from this work that numerous studies confirm the biological activities of the plants extracts. Nevertheless, few bioactive molecules are described as well as the mode of action of the active extracts.

Keywords: *Dialium guineense* Willd. *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br ex Benth. *Tamarindus indica* L. pharmacology, bioactive compound

1. Introduction

Because of their diet and medical care, humans are largely dependent on plants (Uusiku *et al.* 2010) [76]. In Africa, for example, more than eighty percent of the population relies exclusively on plants for healing (World Health Organization, 2013) [79]. While it is true that this practice has existed for thousands of years on the whole surface of the globe, it persists in Benin. This mainly because of the satisfaction of the populations resorting to medicinal plants. Therefore, there is a real culture of traditional medicine in this country, the first resort of eighty percent of the population (Mosnier *et al.* 2006) [53]. The low income of the majority of the population limiting access to modern care (Minot and Daniels, 2005) [50], the lack of social security system and scarcity of hospital facilities or medical staff (especially in rural areas) largely contribute to this situation. Nevertheless, the absence of side effects and low toxicity are worldwide arguments in favor of herbal medicine (Cowan, 1999) [18]; (Iwu *et al.* 1999) [36]. In this context, the Ministry of Health of this country, like many others in Africa, has assigned itself the task of training, promoting and integrating traditional healers into its national health system. At the same time, antibiotic resistance has become a public health problem worldwide (Ventola, 2015) [77], so finding new bioactive molecules has become essential. Plants play an important role in this new battle because their secondary metabolites (papaverine, berberine, curcumin, etc.) have already shown interesting activity both in anti-infectious therapy, and against metabolic or cardiovascular pathologies (Nokta *et al.* 1993) [54]; (Hayashi *et al.* 2007) [31]; (Wang *et al.* 2010) [78]; (Kamatou *et al.* 2006) [38].

Our ethnobotanical inquiry in three medicinal plants markets, and with ten traditional healers revealed a recurrence of *Tamarindus indica* L. *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. Ex Benth. And *Dalium guineense* Willd. As well-known and often combined traditional medicines against microbial infections. The available knowledge on these plants was searched using the key words *Dialium guineense* Willd. *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. Ex Benth., and *Tamarindus indica* L. in 'Google scholar', 'NCBI', 'Springer Link' and 'Web of Science' databases. We formally identified them at the Benin National herbarium where specimen are deposited under Voucher numbers AA 6727/HNB, AA 6728/HNB and AA 6729/HNB respectively.

Their aerial parts are associated in the healing of infectious diseases. This supposed they could contain synergistic compounds and it appears necessary to make the inventory of their known bioactive molecules in order to support this assumption.

Surprisingly, due to their over-exploitation (timber, coal...), or their difficult regeneration linked to a long dormancy (Faustin *et al.* 2013) [25], we also notify that those three plants appear in the top ten plants threatened with extinction in Benin (Lykke, 2000) [44] (Eyog Matig *et al.* 2001) [24] (Meregini, 2005) [47] (Smagadi, 2005) [67] (Ewedje and Tandjiekpon, 2011) [23]. In order to understand why they are combined by traditional healers and to contribute to their safeguarding, this work aims to make an inventory of their known molecules and identify the needs for pharmacological and phytochemical research.

2. Botanic aspects of Fabaceae and known antimicrobials from this family

Dialium guineense Willd. *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. Ex Benth. And *Tamarindus indica* L. are three plants of the Fabaceae family. Still known as Leguminosae (vegetables), Fabaceae, by the number of species (about 19,500), and genera (751), constitute one of the most represented families of the subphylum Angiosperms or Magnoliophyta (Group and

others, 2013) [29]. They have conquered various habitats with varied morphologies ranging from vines to shrubs or trees. An almost exclusive feature of this family is the fixation of atmospheric nitrogen by symbiosis with soil rhizobia. This family identified and described by Adanson then by Jussieu (Adanson, 1763) [1]; (Jussieu, 1789) [37] was subdivided into three subfamilies on the basis of morphological homology criteria: Caesalpinioideae, Mimosoideae, and Papilionoideae. Advances in molecular biology, including sequencing of ribosomal genes (Soltis *et al.* 1997) [68], chloroplasts genes (Savolainen *et al.* 2000) [66], nuclear or mitochondrial genes (Qiu *et al.* 2005) [61] have allowed evolution of taxonomy to become more precise. Thus, a new classification by the 'Legume Phylogeny Working Group' (LPWG) in 2017 reports six subfamilies. Mimosoideae are now divided into four subfamilies: Duparquetioideae, Cercidoideae, Detarioideae (represented by *Tamarindus indica* L.) and Dialioideae of which *Dialium guineense* Willd. is part (Azani *et al.* 2017) [12]. The phylogenetic tree of the Fabaceae is now as shown below (Fig. 1).

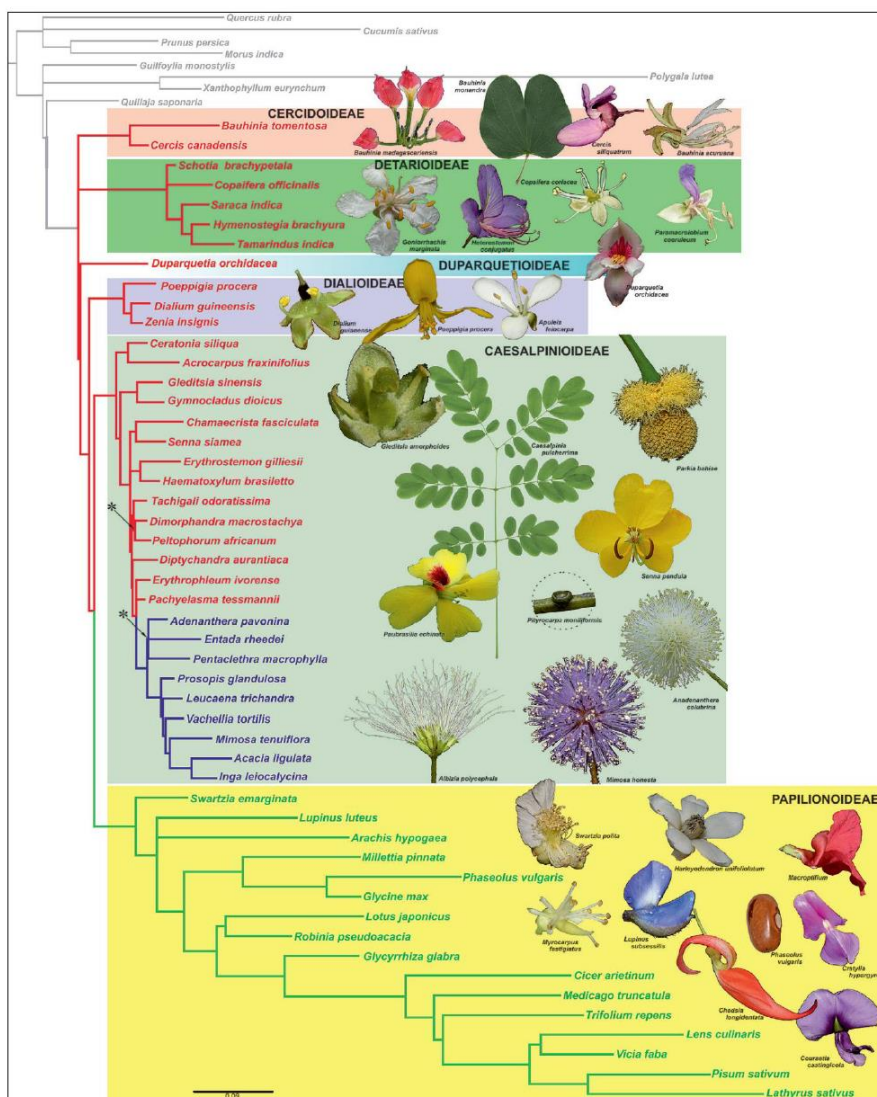


Fig 1: Phylogeny and classification of Fabaceae (Source: LPWG 2017)

Fabaceae are an important source of low-cost protein for many populations in developing countries, as opposed to meat ~ 104 ~

and fish products (Balogun and Fetuga, 1986) [13]. Their use in traditional medicine is widespread (Rosado-Vallado *et al.* 2000) [64]; (Koné *et al.* 2004) [40]; (Ma *et al.* 2011) [45]; (Rahman and Parvin, 2014) [63]. Furthermore, some antibacterial compounds have already been isolated from this family (Dzoyem *et al.* 2017) [20]. It is then reasonable to expect the same from those three plants.

2.1. *Dialium guineense* Willd: botanic, uses and bioactive

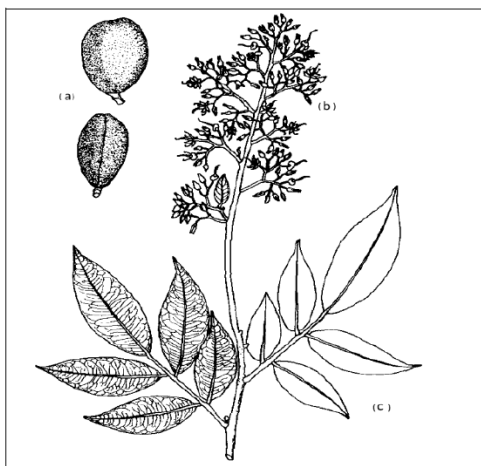


Fig 2: (a) fruit, (b) inflorescence, (c) leaves of *Dialium guineense* Willd. (Drawings by Messrs C.Z. Gbéhou and E.-E. Ewedje. Flore analytique du Bénin).

Roots, leaves and bark of the plant are used in the treatment of malaria, coughs, bronchitis, diarrhea, palpitations, dysmenorrhea, ulcer, anemia, hemorrhoids ("Adjanohoun *et al.* 1989 [4], Banque de données de médecine traditionnelle et pharmacopée. Paris. 124 p. ISBN: 92-9028-146-4," n.d.) (Odukoya *et al.* 1996) [5] (Bero *et al.* 2009) [16]. They are also used for contraception as well as to regulate menstruation. In Nigeria, women use the leaves against genital infections, and to improve lactation whereas twigs are used as native toothbrushes to protect against tooth decay and dental plaque (Bero *et al.* 2009) [16]; (Okwu and Ekeke, 2003) [56]; (Okwu

compounds

Dialium guineense Willd. Belongs to the subfamily of Dialioideae. It is a plant from the regions of tropical Africa, but it is exceptionally present in Sao Tome and Principe. It grows on land left fallow and in dry or dense forests, as well as forest galleries, from Senegal to southern Nigeria. It is noteworthy that, in Benin, this plant is present from the coast to the southern region. Its general morphology is illustrated in Figure 2.

and Ekeke, 2003) [56]; (Lokonon *et al.* 2013) [43]; (Akinpelu *et al.* 2011) [7].

Rich in nutrients (Arogba *et al.* 1994); (Gnansounou *et al.* 2014); (Ayessou *et al.* 2014), black tamarind (*Dialium guineense* Willd.) fruits are widely consumed in Benin. The tree, by its atmospheric nitrogen fixation, contributes to fertilization of the soil whereas leaves and branches are used in lagoon fish culture as abode and fodder (Ewedje and Tandjiekpon, 2011) [23]. On the other hand, the wood is also used in house or attics constructions, traditional tool handles, and charcoal making or as firewood (Lokonon *et al.* 2013) [43].

Table 1: Summary of known molecules from *Dialium guineense* Willd.

Organs	Extraction Solvent (s)	Biological proven activity	Family/Molecules	Active molecules isolated	Reference (s)
Fruit (pulp)	Water	Molluscicide	Saponins	Glycosides triterpenoids	[30]
	Ethanol	detoxification	Flavonoids, phenolic compounds	N.D.	[77]
Bark (stem or root)	Methanol + Water (maceration)	Antibacterial (<i>S. aureus</i>)	Flavonoids, alkaloids, tannins and Saponins	N.D.	[41]
	Ethanol	Antimicrobial	Alkaloids, Flavonoids, tannins and Saponins.	Anthraquinone ^a	[38, 78]
leaves	Hydrodistillation Water (maceration)	Antibacterial (<i>S. aureus</i>)	Flavonoids, alkaloids, tannins and Saponins	N.D.	[41]
	Ethanol	Antibacterial (<i>S. aureus</i>) Antiviral (Herpes type 1)	Flavonoids, alkaloids, tannins and Saponins	N.D.	[41, 79, 40]
	Methanol/Water	Antimicrobial (vibrio)	Flavonoids, alkaloids, tannins, glycosides cardiac, steroids and Saponins	N.D.	[34]
	Methanol	Antimicrobial/Antioxidant	Compounds phenolic	N.D.	[80]
Seeds	Hydrodistillation	Allatocidal	Precocene I (78.8%) β-caryophyllene (5.3%) Valencene (1.4%) cadalene (1%)	Precocene I ^a	[42]
	Tampon Tris-HCl	hemagglutination	Lectin	Glycoprotein DigL	[43]

N.D = Not determined

a= Structure on Fig. 5 below

Most of work listed in Table 1 above have proven the antimicrobial activity of *Dialium guineense* Willd. Extracts.

However, none of them have isolated the active compound. Concerning anthraquinone found in bark extract (Olajubu *et al.* 2012), this latter is able to form an irreversible complex with nucleophilic amino acids leading to an inactivation of the enzymatic proteins containing these specific amino acids (Stern *et al.* 1996). This property is supposed by the authors to be responsible for the antimicrobial activity, but no experiments were reported to date to support their assumptions. Thus, different teams linked the antimicrobial activity to the presence of chemical entities issued from alkaloids, flavonoids, tannins and saponins ("Agassounon *et al.* 2001. Evaluation des activités cytotoxique, antivirale, antibactérienne et antifongique de six plantes," n.d.) (Akinpelu *et al.* 2011)^[7]; (Orji, 2012)^[58] but the exact nature of the active compounds remain unknown. Finally, only two

compounds were clearly identified from this plant and out of the claimed antimicrobial domain: precocene I isolated (Essien *et al.* 2007)^[22] for its allotocidal effect and a glycoprotein named Dig Lhighlighted (Bari *et al.* 2013)^[14] for its hemagglutination effect.

2.2 *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. Ex Benth: botanic, uses and bioactive compounds

P. biglobosa (Jacq.) R. Br. Ex Benth. Is a multi-year Mimosoideae (Hopkins, 1983)^[33]. It is a tree ten to fifteen meters high with a spreading crown. Globular, the flowers are red or orange (Fig. 3) and bloom from December to January, and from February to March (Akoegninou, 2006)^[8]. Concerning its geographical location, this tree is present in tropical Africa between 3° and 15° north.

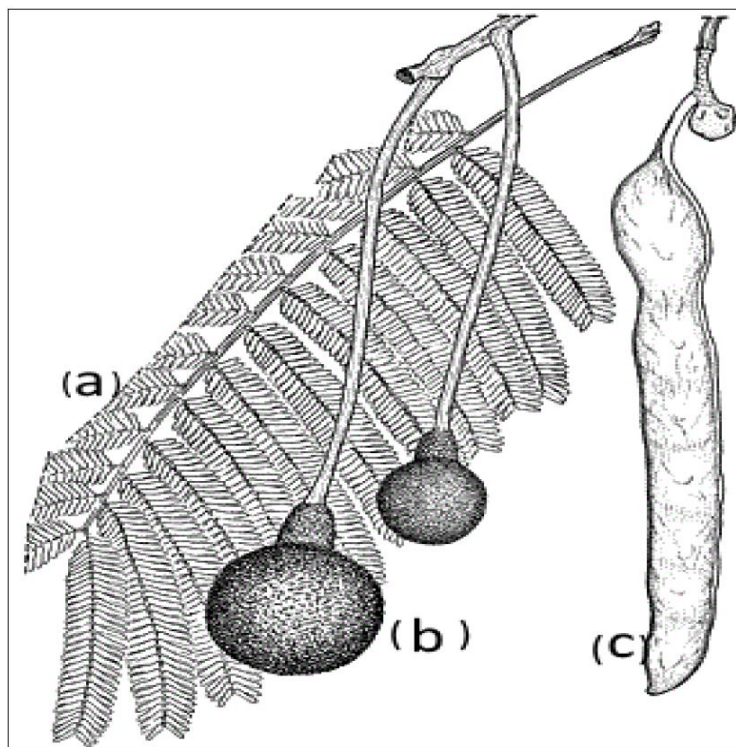


Fig 3: (a) leaves, (b) inflorescence (c) fruit of *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. Ex Benth. (Redrawn and adapted from M.M. Spitteler) / [http://database.prota.org/PROTAhtml/Parkia % 20biglobosa_En.htm](http://database.prota.org/PROTAhtml/Parkia%20biglobosa_En.htm)

Parkia biglobosa (Jacq.) R. Br. Ex Benth occupies the fifth position among the most used plants in traditional Beninese medicine (Eyog Matig *et al.* 2001)^[24]. Its fruits are consumed by humans, and its leaves are used as livestock fodder (Sabiiti and Cobbina, 1992)^[65]. The seeds, by fermentation, are used to prepare a very nourishing local mustard used with different parts of the plant against high blood pressure, hemorrhoids, dermatoses, diabetes, snake venom etc. (Assane *et al.* 1993). For example, the word in Hausa (the language widely spoken in West Africa) for *P. biglobosa* (Jacq.) R. Br. Ex Benth. Is "Dawa Dawa". This word, borrowed from Swahili, refers to the term 'Dawa', used for any plant-based

medication ("Swahili-English Dictionary," n.d.). Like many fruit trees, *P. biglobosa* (Jacq.) R. Br. Ex Benth. Plays an important role in feeding both humans and livestock. It is also used as fuel (Sabiiti and Cobbina, 1992)^[65]; (Ræbild *et al.* 2011)^[62]. Wild animals, including chimpanzees, feed on them, and disperse seeds (Kunz and Linsenmair, 2007)^[42]. The tree is known to farmers to improve soil fertility, and to protect them from erosion (Bayala *et al.* 2007)^[13]. Bark and pods are respectively used as dyeing and pottery colorant (Ouedraogo, 1995)^[59]. Despite this important role, the regeneration of the species is insufficient (Koura *et al.* 2013)^[41].

Table 2: Summary of known molecules from *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. Ex Benth.

Organs	Extraction Solvent(s)	Biological proven activity	Family/Molecules	Active molecules isolated	References
Fruit (pulp)	Acetone	Antioxidant	Polyphenols	N.D.	[81]
Bark (root or stem)	Water	Antioxidant Antibacterial Cicatrizing	Polyphenols	N.D. E. E.	[82, 84, 83, 59]
	Ethanol	Antioxidant Antibacterial Cicatrizing	N.D.	N.D.	[56, 59]
	Methanol + Water	Anti- snake venom	N.D.	N.D.	[84]
	Water + ethanol	Antibacterial macrophages stimulation	Sterols, triterpenes, polyphenols Polysaccharides	N.D. Polysaccharides	[54 55, 85]
	Methanol + Dichloromethane	Antioxidant	Proanthocyanins	Procyanidines, prodelphinidines and they glucuronic derivatives	[86]
	Methanol	Hepatoprotective Antibacterial	Polyphenols	N.D. N.D.	[87, 88]
Leaves	Methanol + Water	Antioxidant, synergy with antibiotics	Polyphenols	N.D.	[89, 90]
	Water	Antioxidant Antibacterial Cicatrizing	N.D.	N.D.	[59]
	Butanol	Antidiabetic	-	Lupeol ^a	[57]
	Ethanol	Antioxidant Antibacterial Cicatrizing	N.D.	N.D.	[59]
	Methanol	Neuroprotection	Polyphenols	Catechin ^a	[58]
Seeds	Water + ethanol	Vasorelaxation	Procyanidines	N.D.	[91]
	Water	Antidiabetic, hypoglycemic and antihypertensive	N.D.	N.D.	[92, 93]
	Methanol	Antidiabetic and hypoglycemic	N.D.	N.D.	[92]
	Sulfate ammonium	Antinociceptif Anti-inflammatory	Lectins	Lectin 4MQ0 ^a	[94]
	Extraction des proteines Ethanol/ Ether petroleum	Antioxidant	Protein	E. O.	[95]
		Pesticide	Polyphenols	N.D.	[96]

* Access code RCSB Protein Databank
N.D. = Not determined

E.O =Elucidation On going
a= Structure on Fig. 5 below

As summarized in Table 2, molecules identified from *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. Ex Benth. Have no relation with its antimicrobial properties ascertained by some authors. For instance, (Millogo-Kone *et al.* 2007) [48] (Millogo-Kone *et al.* 2008) [49] (Adetutu *et al.* 2012) [2] concluded that this plant might contain antibacterial molecules but not clearly identified them until now. On the other hand, lupeol isolated from the leaves' butanol extract is known to stimulates β -cell function and increases insulin secretion by inhibiting α -glucosidase and α -amylase in non-competitive and uncompetitive inhibition patterns respectively (Ibrahim *et al.* 2016) [34]. Concerning catechin obtained from leaves methanol extract, this compound is supposed to be involved in mechanisms capable of boosting cellular thiol contents under conditions of oxidative stress (Komolafe *et al.* 2014) [39] (Gronhaug *et al.* 2008) [59].

2.3 *Tamarindus indica* L.

Tamarindus indica L. is a well known Detarioideae native to tropical Africa where it grows wild. Its name (date of India) derives from Arabic (Tamar Hindi) and refers to India from where it was introduced in Arabia. In Woloff (language widely spoken in Senegal), it is called "Dakkhar" and could be origin of the city name "Dakar" (Tignokpa *et al.* 1986) [74]. It grows very well in semi-humid or arid regions (Meher *et al.* 2014) [46]. It is a large tree up to 25 meters tall (Tariq *et al.* 2013) [73]. The fruit is a pod containing a seed surrounded by fiber and an acidulous pulp widely used as a condiment (Akoegninou, 2006) [8].

The laxative and carminative effects of *Tamarindus indica* L. fruits are well known. Other organs are used in the treatment of a wide range of pathologies such as toothaches (Tapsoba and Deschamps, 2006) [72], bacterial infections, malaria (Doughari, 2006) [19], snake or insect bites, wound healing (Tignokpa *et al.* 1986) [74], conjunctivitis, diabetes (Buchholz

and Melzig, 2016) [17], hypertension, etc. (Havinga *et al.* 2010) [30]. The fruits are also antipyretic (Iwu, 2014) [35], antiscorbutic, hepatoprotective, and used in the treatment of biliary disorder (Morton and Dowling, 1987) [51]. (Tapsoba and Deschamps, 2006) [72] Fruit is both a food (consumed as a drink) and a spice (Hines and Eckman, 1993) [32] (Tsuda *et al.* 1994) [73]. It's subject of intense international trade ("Morton Julia F. 1958 [52] The Tamarind It's food medecinal and industrial uses Florida State Horticultural Society.pdf," n.d.). It is also noteworthy that the tree is useful for the protection of traditional African habitats that are generally fragile typically against wind erosion of soils (Ebifa-Othieno *et al.* 2017) [21].

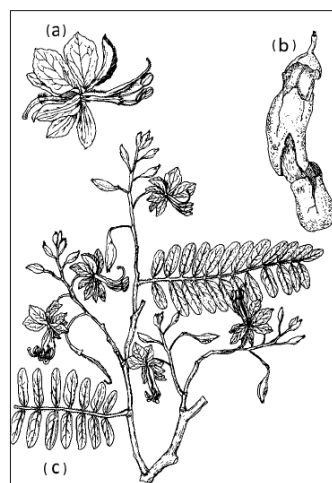


Fig 4: (a) Flower, (b) fruits and (c) leaves of *Tamarindus indica* L. (Illustration: Busson 1965, Flore analytique du Bénin)

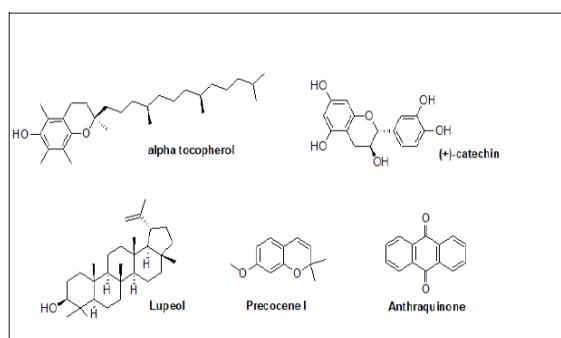
Table 3: Summary of known molecules from *Tamarindus indica L.*

Organs	Extraction Solvent(s)	Biological proven activity	Family/Molecules	active molecules isolated	References
Fruit (pulp)	Water	Antibacterial Antioxidant	Flavonoids, Alkaloids, Tannins, Glycosides cyanogenic and Anthraquinones	N.D.	[97, 98, 99, 100]
	Methanol	Antibacterial Anti-inflammatory Lipid-lowering	Polyphenols, sterols, triterpenes, Alkaloids and tannins	N.D.	[101, 102, 103, 104, 100]
	Ethanol	Antidiabetic Antibacterial Hepatoprotective	Flavonoids, Alkaloids, Tannins, Glycosides cyanogenic and Anthraquinones	N.D.	[97, 99, 105, 106]
	Hexane	Antibacterial	Alkaloids and tannins	N.D.	[102]
	Acetone	Antibacterial	Phenols and Flavones	N.D.	[101]
Bark (stem or root)	Water	Antibacterial	Polyphenols, Sesquiterpenes, Alkaloids Phlobatamines Tannins, Glycosides cyanogenic and Anthraquinones	N.D.	[64, 99]
	Methanol	Antibacterial	Polyphenols, Sesquiterpenes, Alkaloids and Phlobatamines	N.D.	[64]
	Acetone	Antibacterial	Polyphenols, Sesquiterpenes, Alkaloids and Phlobatamines	N.D.	[64]
	Ethanol	Antibacterial	Flavonoids, Alkaloids, Tannins, Glycosides cyanogenic and Anthraquinones	N.D.	[99, 107]
Leaves	Water	Antibacterial	Polyphenols, Sesquiterpenes, Alkaloids and Phlobatamines	N.D.	[64, 99, 100]
	Methanol	Antibacterial Antioxidant	Polyphenols, Sesquiterpenes, Alkaloids and Phlobatamines	N.D.	[64, 100, 108]
	Acetone	Antibacterial	Polyphenols, Sesquiterpenes, Alkaloids and Phlobatamines	N.D.	[64]
	Ethanol	Antibacterial	Flavonoids, Alkaloids, Tannins, Glycosides cyanogenic and Anthraquinones	N.D.	[99]
Seeds	Water	Antioxidant Antidiabetic Cicatrizing	Polyphenols Glycosides Sugars	N.D.	[98, 109, 110]
	Ethanol	Growth factor (antibiotic) Antioxidant Cicatrizing	Carbohydrates Compounds phenolic unsaturated fatty acids	Tocopherol ^a	[73, 111, 109]
	Tampon de lyse A	proteinase inhibitor	Protein	Kunitz type proteinase inhibitor	[76, 109]
	Methanol	Cicatrizing	N.D.	N.D.	[109]
	Tampon phosphate saline	Cicatrizing	Alkaloids Tannins Saponins	N.D.	[109]

N.D = Not determined

a=Structure on Fig. 5 below

Table 3 above show that few molecules are well describe from *Tamarindus indica* and have no direct relation with its antiacetal activity. Alpha tocopherol was isolated from seeds ethanol extract (Aengwanich *et al.* 2009) [5] and is a well-known antioxidant compound ((Gordon, 1990) [27] (Suzuki *et al.* 1993) [70]. A protein isolated from this plant has been identified as a Kunitz type proteinase inhibitor (Patil *et al.* 2009) [60]. The third reported molecule from *Tamarindus indica L.* is tamarindial or (3*E*)-2, 5-Dioxo-3- hexenal: the bitter principle of the fruits but until now no interesting biological activity was related to this molecule.

**Fig 5:** Structures of known molecules from the three plants

Conclusion

Although present work highlights numerous studies on the pharmacological activities of the three plants that have been tested and proven, there is no antimicrobial active molecule described. This lack of knowledge about the bioactive compounds of the three plants don't allow an objective study of their combined use against infectious diseases by Benin traditional healers. We then think it would be interesting to test the extracts together, to select the more efficient combination and fractionate it. Antibiotic resistance proving to be a global health priority, this could be a promising way in the search for new antibacterial molecules.

Reference

- Adanson M. Familles des plantes. Par M. Adanson. Vincent, Paris, 1763.
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.271>
- Adetutu A, Morgan WA, Corcoran O, Chimezie F. Antibacterial activity and *in vitro* cytotoxicity of extracts and fractions of *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth. Stem bark and *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. Environ. Toxicol. Pharmacol. 2012; 34:478-483.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.06.008>
- Adjanohoun. Banque de données de médecine traditionnelle et pharmacopée. Paris, 1989, 124. ISBN: 92-9028-146-4, n.d.
- Aengwanich W, Suttajit M, Srikhun T, Boonsorn T, others. Antibiotic effect of polyphenolic compound extracted from tamarind (*Tamarindus indica L.*) seed

- coat on productive performance of broilers. *Int J Poult Sci.* 2009; 8:749-751.
6. Agassounou. Evaluation des activités cytotoxique, antivirale, antibactérienne et antifongique de six plantes, n.d, 2001.
 7. Akinpelu DA, Olaniyi AT, Mayowa AO, Olayinka AA, Anthony OI. Anti-Vibrio and preliminary phytochemical characteristics of crude methanolic extracts of the leaves of *Dialium guineense* (Willd). *J Med. Plants Res.* 2011; 5:2398-2404.
 8. Akoegninou A. (Ed.), Flore analytique du Benin, Wageningen University papers. Backhuys, Wageningen, 2006.
 9. Arogba SS, Ajiboro AA, Odukwè IJ. A physico-chemical study of nigerian velvet tamarind (*Dialium guineense* L) fruit. *J Sci. Food Agric.* 1994; 66:533-534.
 10. Assane M, Baba Moussa R, Bassene E, Sere A. [Antihypertensive action of *Parkia biglobosa*+(Jacq) Benth seeds in the rat]. *Dakar Med.* 1993; 38:49-54.
 11. Ayessou NC, Ndiaye C, Cissé M, Gueye M, Sakho M, Dormier M. Nutrient composition and nutritional potential of wild fruit *Dialium guineense*. *J Food Compos. Anal.* 2014; 34:186-191.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.01.002>
 12. Azani N, Babineau M, Bailey CD, Banks H, Barbosa A, Pinto RB. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny-The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *Taxon.* 2017; 66:44-77.
<https://doi.org/10.12705/661.3>
 13. Balogun AM, Fetuga BL. Chemical composition of some underexploited leguminous crop seeds in Nigeria. *J Agric. Food Chem.* 1986; 34:189-192.
<https://doi.org/10.1021/jf00068a008>
 14. Bari AU, Silva HC, Silva MTL, Pereira Júnior FN, Cajazeiras JB, Sampaio AH *et al.* Purification and partial characterization of a new mannose/glucose-specific lectin from *Dialium guineense* Willd seeds that exhibits toxic effect: Purification of a Lectin from *Dialium Guineense* Willd Seeds. *J Mol. Recognit.* 2013; 26:351-356.
<https://doi.org/10.1002/jmr.2279>
 15. Bayala J, Balesdent J, Marol C, Zapata F, Teklehaimanot Z, Ouedraogo SJ. Relative contribution of trees and crops to soil carbon content in a parkland system in Burkina Faso using variations in natural ¹³C abundance. *Nutr. Cycl. Agroecosystems.* 2007; 76:193-201.
<https://doi.org/10.1007/s10705-005-1547-1>
 16. Bero J, Ganfon H, Jonville MC, Frédéric M, Gbaguidi F, DeMol P *et al.* *In vitro* antiplasmodial activity of plants used in Benin in traditional medicine to treat malaria. *J Ethnopharmacol.* 2009; 122:439-444.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.02.004>
 17. Buchholz T, Melzig MF. Medicinal Plants Traditionally Used for Treatment of Obesity and Diabetes Mellitus-Screening for Pancreatic Lipase and α -Amylase Inhibition. *Phytother. Res. PTR.* 2016; 30:260-266.
<https://doi.org/10.1002/ptr.5525>
 18. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12:564-582.
 19. Doughari JH. Antimicrobial activity of *Tamarindus indica* Linn. *Trop. J Pharm. Res.* 2006; 5:597-603.
 20. Dzoyem JP, Melong R, Tsamo AT, Tchinda AT, Kapche DGWF, Ngadjui BT *et al.* Cytotoxicity, antimicrobial and antioxidant activity of eight compounds isolated from *Entada abyssinica* (Fabaceae). *BMC Res. Notes*, 2017, 10.
<https://doi.org/10.1186/s13104-017-2441-z>
 21. Ebifa-Othieno E, Mugisha A, Nyeko P, Kabasa JD. Knowledge, attitudes and practices in tamarind (*Tamarindus indica* L.) use and conservation in Eastern Uganda. *J Ethnobiol. Ethnomedicine.* 2017, 13.
<https://doi.org/10.1186/s13002-016-0133-8>
 22. Essien E, Ogunwande IA, Ogunbinu AkO, Flamini G, Cioni PL. Analysis of the Essential Oil of *Dialium guineense* Willd. *J Essent. Oil Res.* 2007; 19:545-547.
<https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699327>
 23. Ewedje EEB, Tandjiekpon A. Velvet tamarind (*Dialium guineense*), 2011.
 24. Eyog Matig O, Adjanohoun E, de Souza S, Sinsin B. Programme de Ressources Genetiques Forestieres en Afrique au Sud du Sahara (Programme Saforgen). Bioversity International, 2001.
 25. Faustin AY, Djègo JG, Sinsin B. Capacité de germination de *Dialium guineense* Willd (fabaceae) une espèce agroforestière. *J Appl. Biosci.* 2013; 62:4566-4581.
 26. Gnansounou. Proximate composition and micronutrient potentials of *Dialium guineense* wild growing in Benin. *Int. Food Res. J.* 2014, 25:36-42.
 27. Gordon MH. The Mechanism of Antioxidant Action *in Vitro*, in: Hudson BJF. (Ed.), *Food Antioxidants*. Springer Netherlands, Dordrecht, 1990, 1-18.
https://doi.org/10.1007/978-94-009-0753-9_1
 28. Gronhaug TE, Glaeserud S, Skogsrud M, Ballo N, Bah S, Diallo D, Paulsen BS. Ethnopharmacological survey of six medicinal plants from Mali, West-Africa. *J Ethnobiol. Ethnomedicine.* 2008; 4:26.
<https://doi.org/10.1186/1746-4269-4-26>
 29. Group LPW. Others, Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon.* 2013; 62:217-248.
 30. Havinga RM, Hartl A, Putscher J, Prehler S, Buchmann C, Vogl CR. *Tamarindus indica* L. (Fabaceae): Patterns of use in traditional African medicine. *J Ethnopharmacol.* 2010; 127:573-588.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.11.028>
 31. Hayashi K, Minoda K, Nagaoka Y, Hayashi T, Uesato S. Antiviral activity of berberine and related compounds against human cytomegalovirus. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007; 17:1562-1564.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.12.085>
 32. Hines DA, Eckman K. Indigenous multipurpose trees of Tanzania: uses and economic benefits for people, 1993.
 33. Hopkins HC. The taxonomy, reproductive biology and economic potential of *Parkia* (Leguminosae: Mimosoideae) in Africa and Madagascar. *Bot. J Linn. Soc.* 1983; 87:135-167.
 34. Ibrahim MA, Habila JD, Koorbanally NA, Islam MS. Butanol fraction of *Parkia biglobosa* (Jacq.) G. Don leaves enhance pancreatic β -cell functions, stimulates insulin secretion and ameliorates other type 2 diabetes-associated complications in rats. *J Ethnopharmacol.* 2016; 183:103-111.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.018>
 35. Iwu MM. Handbook of African medicinal plants, 2. ed. ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 2014.
 36. Iwu MM, Duncan AR, Okunji CO. New antimicrobials of plant origin. *Perspect. New Crops New Uses ASHS Press Alex. VA.* 1999; 457-462.
 37. Jussieu AL. de, *Genera plantarum secundum ordines*

- naturales disposita, juxta methodum in Horto Regio Parisiensi exaratum, anno M.DCC. LXXIV. Apud Viduam Herissant ET Theophilum Barrois, Parisiis, 1789.
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.7762>
38. Kamatou GP, Van Zyl RL, Van Vuuren SF, Viljoen AM, Figueiredo AC, Barroso JG *et al.* Chemical Composition, Leaf Trichome Types and Biological Activities of the Essential Oils of Four Related *Salvia* Species Indigenous to Southern Africa. *J Essent. Oil Res*, 2006, 18.
 39. Komolafe K, Olaleye TM, Seeger RL, Carvalho FB, Boligon AA, Athayde ML *et al.* *Parkia biglobosa* improves mitochondrial functioning and protects against neurotoxic agents in rat brain hippocampal slices. *BioMed Res. Int*, 2014, 326290.
<https://doi.org/10.1155/2014/326290>
 40. Koné W, Atindehou KK, Terreaux C, Hostettmann K, Traoré D, Dosso M. Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol*. 2004; 93:43-49.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.03.006>
 41. Koura K, Dissou E, Ganglo J. Caractérisation écologique et structurale des parcs à néré [*Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. Ex G. Don] du département de la Donga au Nord-Ouest du Bénin. *Int. J Biol. Chem. Sci*, 2013, 7.
<https://doi.org/10.4314/ijbcs.v7i2.27>
 42. Kunz BK, Linsenmair KE. Changes in Baboon Feeding Behavior: Maturity-dependent Fruit and Seed Size Selection within a Food Plant Species. *Int. J Primatol*. 2007; 28:819-835.
<https://doi.org/10.1007/s10764-007-9160-6>
 43. Lokonon BE, Bonou WN, Kassa B, Azihou AF, Assogbadjo E, Glelekakai R. Structural and ethnobotanical characterization of velvet tamarind (*Dialium guineense* Willd), a multipurpose tree species. *Agron. Afr*. 2013; 25:121-131.
 44. Lykke AM. Local perceptions of vegetation change and priorities for conservation of woody-savanna vegetation in Senegal. *J Environ. Manage*. 2000; 59:107-120.
<https://doi.org/10.1006/jema.2000.0336>
 45. Ma X, Zheng C, Hu C, Rahman K, Qin L. The genus *Desmodium* (Fabaceae)-traditional uses in Chinese medicine, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol*. 2011; 138:314-332.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.053>
 46. Meher B, Dash DK, Roy A. A review on: Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of *Tamarindus indica* L. *World J Pharm Pharm. Sci*. 2014; 3:229-240.
 47. Meregini AOA. Some endangered plants producing edible fruits and seeds in Southeastern Nigeria. *Fruits*. 2005; 60:211-220.
<https://doi.org/10.1051/fruits:2005028>
 48. Millogo-Kone H, Guissou I, Nacoulma O, Traore AS. Antimicrobial effects of the stem bark extracts of *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth. On Shigellae. *Afr. J Tradit. Complement. Altern. Med. Ajtcam*. 2007; 4:392-396.
 49. Millogo-Kone H, Guissou IP, Nacoulma O, Traore AS. Comparative study of leaf and stem bark extracts of *Parkia biglobosa* against enterobacteria. *Afr. J Tradit. Complement. Altern. Med. Ajtcam*. 2008; 5:238-243.
 50. Minot N, Daniels L. Impact of global cotton markets on rural poverty in Benin. *Agric. Econ*. 2005; 33:453-466.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-0864.2005.00415.x>
 51. Morton JF, Dowling CF. Fruits of warm climates. JF. Morton, Miami, FL, 1987.
 52. Morton Julia F. The Tamarind It's food medicinal and industrial uses Florida State Horticultural Society. pdf, n.d, 1958.
 53. Mosnier C, Van De Moortel C, Ridier A, Kephaliacos C, Daniel K. Others, Conditionnalités des aides directes: impact de la mise en oeuvre de certaines BCAE dans des exploitations d'élevage et de grandes cultures, 2006.
 54. Nokta M, Albrecht T, Pollard R. Papaverine hydrochloride: effects on HIV replication and T-lymphocyte cell function. *Immunopharmacology*. 1993; 26:181-185.
[https://doi.org/10.1016/0162-3109\(93\)90010-N](https://doi.org/10.1016/0162-3109(93)90010-N)
 55. Odukoya OA, Houghton PJ, Adelusi A, Omogbai EKI, Sanderson L, Whitfield PJ. Molluscicidal triterpenoid glycosides of *Dialium guineense*. *J Nat. Prod*. 1996; 59:632-634.
 56. Okwu DE, Ekeke O. Phytochemical screening and mineral composition of chewing sticks in South Eastern Nigeria. *Glob. J Pure Appl. Sci*, 2003, 9.
<https://doi.org/10.4314/gjpas.v9i2.15962>
 57. Olajubu F, Akpan I, Ojo DA, Oluwalana S. Antimicrobial potential of *Dialium guineense* (Wild.) stem bark on some clinical isolates in Nigeria. *Int. J Appl. Basic Med. Res*. 2012; 2:58-62.
<https://doi.org/10.4103/2229-516X.96811>
 58. Orji. Antibacterial Activities of Crude Leaf and Bark Extracts of "Icheku" *Dialium guineense* on Bacterial Isolates from Bronchitis Patients. *IOSR J Pharm. Biol. Sci*. 2012; 1:21-25.
<https://doi.org/10.9790/3008-0132125>
 59. Ouédraogo AS. *Parkia biglobosa* (Leguminosae) en Afrique de l'Ouest: biosystématique et amélioration. [sn], 1995.
 60. Patil DN, Preeti Chaudhry A, Sharma AK, Tomar S, Kumar P. Purification, crystallization and preliminary crystallographic studies of a Kunitz-type proteinase inhibitor from tamarind (*Tamarindus indica*) seeds. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun*. 2009; 65:736-738.
<https://doi.org/10.1107/S1744309109023495>
 61. Qiu Y, Dombrowska O, Lee J, Li L, Whitlock BA, Bernasconi-Quadroni F *et al.* Phylogenetic Analyses of Basal Angiosperms Based on Nine Plastid, Mitochondrial, and Nuclear Genes. *Int. J Plant Sci*. 2005; 166:815-842.
<https://doi.org/10.1086/431800>
 62. Ræbild A, Larsen AS, Jensen JS, Ouedraogo M, De Groote S, Van Damme P *et al.* Advances in domestication of indigenous fruit trees in the West African Sahel. *New For*. 2011; 41:297-315.
<https://doi.org/10.1007/s11056-010-9237-5>
 63. Rahman AM, Parvin MIA. Study of medicinal uses on Fabaceae family at Rajshahi, Bangladesh. *Res. Plant Sci*. 2014; 2:6-8.
 64. Rosado-Vallado M, Brito-Loeza W, Mena-Rejón G, Quintero-Marmol E, Flores-Guido J. Antimicrobial activity of Fabaceae species used in Yucatan traditional medicine. *Fitoterapia*. 2000; 71:570-573.
[https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00200-8](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00200-8)
 65. Sabiiti EN, Cobbina J. *Parkia biglobosa*: a potential multipurpose fodder tree legume in West Africa. *Int. Tree Crops J*. 1992; 7:113-139.
<https://doi.org/10.1080/01435698.1992.9752911>
 66. Savolainen V, Fay MF, Albach DC, Backlund A, Van

- Der Bank M, Cameron KM *et al.* Phylogeny of the Eudicots: A Nearly Complete Familial Analysis Based on rbcL Gene Sequences. *Kew Bull.* 2000; 55:257.
<https://doi.org/10.2307/4115644>
67. Smagadi A. Accès aux ressources génétiques et partage des avantages découlant de leur exploitation: la Convention sur la diversité biologique et le système mondial de la FAO. *Rev. Eur. Droit Environ.* 2005; 9:255-273.
68. Soltis DE, Soltis PS, Nickrent DL, Johnson LA, Hahn WJ, Hoot SB *et al.* Angiosperm Phylogeny Inferred from 18S Ribosomal DNA Sequences. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 1997; 84:1
<https://doi.org/10.2307/2399952>
69. Stern JL, Hagerman AE, Steinberg PD, Mason PK. Phlorotannin-protein interactions. *J Chem. Ecol.* 1996; 22:1877-1899.
70. Suzuki YJ, Tsuchiya M, Wassall SR, Choo YM, Govil G, Kagan VE *et al.* Structural and dynamic membrane properties of Alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol: Implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. *Biochemistry (Mosc.)*. 1993; 32:10692-10699.
71. Swahili-English Dictionary [WWW Document], n.d. URL.
<http://www.goswahili.org/dictionary/> (accessed 9.26.17).
72. Tapsoba H, Deschamps JP. Use of medicinal plants for the treatment of oral diseases in Burkina Faso. *J Ethnopharmacol.* 2006; 104:68-78.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.047>
73. Tariq M, Chaudhary SS, Rahman KH, Zaman R, Shaikh I. *Tamarindus Indica*: An Overview. *J Biol. Sci. Opin.* 2013; 1:128-131.
<https://doi.org/10.7897/2321-6328.01220>
74. Tignokpa M, Laurens A, Mboup S, Sylla O. Plantes médicinales populaires des marchés de Dakar (Senegal). *Int. J Crude Drug Res.* 1986; 24:75-80.
75. Tsuda T, Watanabe M, Ohshima K, Yamamoto A, Kawakishi S, Osawa T. Antioxidative components isolated from the seed of tamarind (*Tamarindus indica* L.). *J Agric. Food Chem.* 1994; 42:2671-2674.
76. Uusiku NP, Oelofse A, Duodu KG, Bester MJ, Faber M. Nutritional value of leafy vegetables of sub-Saharan Africa and their potential contribution to human health: A review. *J. Food Compos. Anal.* 2010; 23:499-509.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.05.002>
77. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharm. Ther.* 2015; 40:277.
78. Wang Z, Xue Y, Liu Y. The modulation of protein kinase A and heat shock protein 70 is involved in the reversible increase of blood-brain tumor barrier permeability induced by papaverine. *Brain Res. Bull.* 2010; 83:367-373.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2010.08.009>
79. World Health Organization (Ed.). WHO traditional medicine strategy. 2014-2023. World Health Organization, Geneva, 2013.

Article 2

Senankpon Martial Gnansounou, Samy Iskandar, Lydia Abou, Maxime Robin, Carole Di Giorgio, Edwige Dahouenon Ahoussi, Philippe Piccerelle and Dominique Koko Sonhounhlou. GC-MS Screening and Evaluation of the Anti-inflammatory and Antioxidant Activities of Ethanolic Leaves and Stem Barks Extracts from *Dialium guineense* Willd, *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. ex Benth. and *Tamarindus indica* L. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2019; 8(1): 295-301.

Bien qu'étant un processus naturel, le vieillissement peut être accéléré par le stress oxydatif. Ce dernier est étroitement lié aux processus inflammatoires. Induite par les infections microbiennes, les allergènes, les radiations, les xénobiotiques etc. la réponse inflammatoire peut être aiguë ou chronique. Généralement bénéfique pour l'hôte, l'inflammation aiguë est une étape initiale médiée par l'activation du système immunitaire inné. Si elle dure longtemps, la deuxième étape de l'inflammation ou inflammation chronique s'installe et peut conduire à diverses pathologies chroniques, y compris le cancer. En effet, les leucocytes recrutés sur le site de la lésion induisent une stimulation du métabolisme oxydatif (cytochrome P450 des mitochondries, peroxyosomes) d'où une libération et une accumulation accrue d'espèces réactives de l'oxygène. La défense de l'organisme humain contre la toxicité de ces radicaux libres est assurée par des enzymes comme la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase. Pourtant, il arrive qu'un déséquilibre s'installe entre la production de radicaux libres et le système antioxydant de l'organisme en faveur des radicaux libres : c'est le stress oxydatif.

Les espèces réactives de l'oxygène ont normalement un rôle bénéfique comme messagers secondaires capables de réguler l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription. Elles ne deviennent toxiques que si leur concentration s'accroît à cause du stress oxydatif. Pour éviter le stress oxydatif, un apport suffisant d'antioxydants est donc nécessaire. Ces derniers agissent en piégeant les radicaux libres évitant ainsi l'oxydation de l'ADN, des lipides et des glucides.

Les inflammations et le stress oxydatif étant mis en cause dans des cas de diabète, de cancers ou de maladies cardiovasculaires, la recherche d'antioxydants et d'anti-inflammatoires dépasse désormais le cadre anti-âge ou cosmétique. En Afrique et dans de

nombreux pays à revenu faible ou intermédiaire, les connaissances traditionnelles basées sur les plantes médicinales sont utilisées pour lutter contre le stress oxydatif et l'inflammation.

Dans un second temps, notre étude a donc porté sur les activités anti-inflammatoire et antioxydante des feuilles et écorces de *D. guineense* Willd, *P. biglobosa* (Jacq.) R. Br. ex Benth. et *T. indica* L. Nous avons ensuite, dans l'optique de formulation galénique à usage cutanée, estimé la phototoxicité des extraits et en avons évalué les compositions chimiques.

Le test KRL (Kit Radicaux Libres) fut utilisé pour déterminer l'activité antioxydante de nos extraits. Ce test permet d'évaluer la résistance globale du sang standardisé de cheval soumis à une attaque radicalaire. Les défenses antioxydantes intra- et extra-cellulaires contribuent au maintien de l'intégrité membranaire et des fonctions cellulaires jusqu'à la lyse des cellules sanguines. Le KRT permet donc une mesure dynamique du potentiel global de défense antiradicalaire d'un individu. Il permet également de déterminer in vitro, dans des conditions biologiques, la capacité "antioxydante" ou l'action "pro-oxydante" d'un composé. Ainsi, en ajoutant au milieu un composé à action antiradicalaire, il y a augmentation du potentiel global de défense contre l'agression radicalaire d'un sang témoin (sang de cheval standardisé). Au contraire en ajoutant un composé à action pro-radicalaire, il y a diminution la capacité antiradicalaire globale du sang témoin. La résistance globale du sang témoin à l'attaque radicalaire en présence ou non du produit est exprimée par le temps au bout duquel 50% des cellules sanguines sont lysées ($T_{1/2}$ en minutes). L'efficacité antiradicalaire des produits est alors exprimée en pourcentage du potentiel global de défense antiradicalaire du sang témoin (% $T_{1/2}$ du sang témoin). Les résultats sont standardisés en équivalents Trolox (analogue hydrosoluble de la vitamine E) et/ou en équivalents Acide gallique (acide phénolique).

Le test anti-inflammatoire in vitro utilisé dans la présente étude repose sur la capacité des macrophages à générer une forte réponse inflammatoire lorsqu'ils sont stimulés par des antigènes. Des macrophages immortalisés de souris (lignée cellulaire RAW 264.7) ont été stimulés par une LPS (endotoxine) d'*Escherichia coli* et exposés aux extraits à tester pendant 24 heures. À la fin de la période d'incubation, la production de NO est évaluée indirectement en mesurant l'accumulation de nitrite / nitrate (produits finaux stables de l'oxydation du NO) dans le milieu de culture à l'aide d'une méthode spectrophotométrique basée sur la réaction de Griess. La dexaméthasone fut utilisée comme contrôle positif.

Parallèlement à l'évaluation de la libération de NO, la viabilité cellulaire a été mesurée pour valider le test. Le réactif colorant vital WST-1 a été utilisé pour mesurer la respiration mitochondriale des cellules.

Les extraits de *Dialium guineense* (feuilles et tige), des feuilles de *Parkia biglobosa* et des écorces de *Tamarindus indica* ont exercé une activité anti-inflammatoire supérieure à celle de la dexaméthasone. L'écorce de *Dialium guineense* a montré la meilleure activité anti-inflammatoire et contient du sitostérol et de l'acétate de lupéol, molécules sont connues pour leur activité anti-inflammatoire intéressante. Ces molécules sont rapportées ici pour la première fois dans *D. guineense*. En synergie avec les composés phénoliques contenus dans cet extrait, elles pourraient expliquer nos résultats et confirmer la pertinence de l'utilisation de *Dialium guineense* par les guérisseurs traditionnels. Toutefois, la phototoxicité de cet extrait rend son utilisation hypothétique dans la formulation d'anti-inflammatoires à usage cutané. En revanche, les feuilles de cette même plante ne sont pas photo-toxiques mais ont une activité anti-inflammatoire réduite de moitié par rapport aux écorces. Elles ont une teneur plus élevée en sitostérol (3,5%) et en acétate de lupéol (1,7%), ce qui semblent jouer un rôle clé dans la phototoxicité. En effet ces molécules sont également plus abondantes dans les feuilles de *P. biglobosa* (2,02% et 4,41%) et dans l'écorce de *T. indica* (0,80% et 1,53% respectivement).

Les résultats du test KRL (Kit Radicaux Libres) indiquent que tous les extraits testés ont une activité antiradicalaire dose- dépendante. À 20 mg/L, les feuilles de *Parkia biglobosa* ainsi que les feuilles et écorces de *Tamarindus indica* ont des résultats remarquables. Ils ont augmenté la résistance à une attaque radicalaire du sang témoin à 109.48, 265.36 et 117.55% respectivement. En outre, ces extraits se sont révélés tout au moins aussi efficaces que le Trolox et l'acide gallique. L'extrait d'écorce de *Tamarindus indica* est particulièrement intéressant. Cinq fois plus actif que le Trolox et 2,5 fois plus actif que l'acide gallique, il contient du lupéol (0,83%), de l'amyrine (0,65%) et de l'acétate de lupéol (1,53%). Ces molécules ont déjà été rapportées dans la plante et leur propriété de piégeage des radicaux libres est bien connue.

L'extrait des feuilles de *Parkia biglobosa* a une activité antioxydante de 109,48% selon le test KRL. Il contient de la lupénone (2,59%), de la β -amyrine (1,05%), du sitostérol (2,02%) et de l'acétate de lupéol (4,41), tous connus pour leur activité anti-inflammatoire ou antioxydante. Le sitostérol et l'acétate de lupéol sont décrits ici pour la première fois dans la

plante. Ils semblent contribuer aux activités anti-inflammatoire et antioxydante de cet extrait telles que rapportés par plusieurs auteurs.

Les composés chimiques identifiés par GC-MS dans les extraits l'ont été par comparaison directe (avec une correspondance d'au moins 80%) des temps de rétention et des données spectrales de masse avec ceux des bibliothèques de l'Institut national de la normalisation et de la technologie (NIST) et de WILLEY.



E-ISSN: 2278-4136
 P-ISSN: 2349-8234
 JPP 2019; 8(1): 295-301
 Received: 21-11-2018
 Accepted: 25-12-2018

Senankpon Martial Gnansounou
 (1) Laboratoire d'Etude et de Recherche en Chimie Appliquée, Université d'Abomey Calavi, Abomey Calvi, Benin
 (2) Laboratoire de Pharmacie Galénique, Pharmacotechnie Industrielle, Biopharmacie et Cosmétologie, Faculté de Pharmacie, Aix Marseille Université, 27 Blvd Jean Moulin, Marseille 13385, France
 (3) IMBE (Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et Continentale), UMR CNRS 7263, IRD 237, Faculté de Pharmacie, Aix Marseille Université, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, France

Samy Iskandar
 (1) Laboratoire de Pharmacie Galénique, Pharmacotechnie Industrielle, Biopharmacie et Cosmétologie, Faculté de Pharmacie, Aix Marseille Université, 27 Blvd Jean Moulin, Marseille 13385, France
 (2) IMBE (Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et Continentale), UMR CNRS 7263, IRD 237, Faculté de Pharmacie, Aix Marseille Université, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, France

Lydia Abou
 Laboratoire de Chimie Analytique, Qualitologie et Nutrition, UMR 910Génétique, UMR 1260 INRA/INSERM UMR-S 1263 CUVN Faculté de Pharmacie, 27 Blvd Jean Moulin, Marseille 13385, France

Maxime Robin
 (1) Laboratoire de Pharmacie Galénique, Pharmacotechnie Industrielle, Biopharmacie et Cosmétologie, Faculté de Pharmacie, Aix Marseille Université, 27 Blvd Jean Moulin, Marseille 13385, France
 (2) IMBE (Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et Continentale), UMR CNRS 7263, IRD 237, Faculté de Pharmacie, Aix Marseille Université, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, France

Carole DI Giorgio
 IMBE (Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et Continentale), UMR CNRS 7263, IRD 237, Faculté de Pharmacie, Aix Marseille Université, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, France

Edwige Dahouenon Ahoussi
 Laboratoire de Pharmacie Galénique, Pharmacotechnie Industrielle, Biopharmacie et Cosmétologie, Faculté de Pharmacie, Aix Marseille Université, 27 Blvd Jean Moulin, Marseille 13385, France

Philippe Piccerelle
 (1) Laboratoire de Pharmacie Galénique, Pharmacotechnie Industrielle, Biopharmacie et Cosmétologie, Faculté de Pharmacie, Aix Marseille Université, 27 Blvd Jean Moulin, Marseille 13385, France
 (2) IMBE (Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et Continentale), UMR CNRS 7263, IRD 237, Faculté de Pharmacie, Aix Marseille Université, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, France

Dominique Koko Sonhounhloou
 Laboratoire d'Etude et de Recherche en Chimie Appliquée, Université d'Abomey Calavi, Abomey Calvi, Benin

Correspondence
 Senankpon Martial Gnansounou
 (1) Laboratoire d'Etude et de Recherche en Chimie Appliquée, Université d'Abomey Calavi, Abomey Calvi, Benin
 (2) Laboratoire de Pharmacie Galénique, Pharmacotechnie Industrielle, Biopharmacie et Cosmétologie, Faculté de Pharmacie, Aix Marseille Université, 27 Blvd Jean Moulin, Marseille 13385, France
 (3) IMBE (Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et Continentale), UMR CNRS 7263, IRD 237, Faculté de Pharmacie, Aix Marseille Université, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, France

GC-MS screening and evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of ethanolic leaves and stem barks extracts from *Dialium guineense* Willd, *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. ex Benth. and *Tamarindus indica* L

Senankpon Martial Gnansounou, Samy Iskandar, Lydia Abou, Maxime Robin, Carole DI Giorgio, Edwige Dahouenon Ahoussi, Philippe Piccerelle and Dominique Koko Sonhounhloou

Abstract

Inflammation has been shown to be greatly involved in the degenerative processes of human skin such as photo aging and atopy. Reduction of low-grade inflammatory reactions by topical products may be necessary in case of skin aggression, to obtain an optimal wound healing and restore the physiological balance of human skin. Present work evaluated the antioxidant, anti-inflammatory and phototoxic properties of ethanolic extracts from leaves and stem barks of *Dialium guineense* Willd., *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. Ex Benth. and *Tamarindus indica* L. The antioxidant power of the extracts, measured *in vitro* by the KRL method, showed that each gram of *D. guineense* bark extract, *P. biglobosa* leaves extract and *T. indica* bark and leaves extracts has an antioxidant capacity equivalent to 1585, 2092, 5071 and 2246 mg of Trolox respectively. Simultaneously with their actions on cell viability, the anti-inflammatory activity of the extracts was monitored measuring their effects on NO production by mouse macrophages submitted to LPS from *E. coli* to determine the anti-inflammatory ratio of each extract. The bark and leaves of *D. guineense* Willd., the leaves of *P. biglobosa* (Jacq.) R. Br. Ex Benth. and the bark of *T. indica* L. have anti-inflammatory ratios from 161 to 458.2, whereas Dexamethasone (positive control) has a ratio of 37.87. The *in vitro* 3T3 NRU test was used on mouse fibroblasts to determine the phototoxicity of the six extracts. Only *D. guineense* Willd. stem bark was photo-toxic with a photo-irritation factor greater than 5 (PIF = 8.39). Our study report some molecules such as lupeol, amaryn, sitosterol for the first time in the extracts and shows that the use of these plants in traditional medicine is justified.

Keywords: anti-inflammatory, antioxidant, GC-MS, ethanolic extracts, lupeol, sitosterol, stigmasterol

Introduction

Living beings have two major common enemies: aging and diseases. Although a natural process, aging can be accelerated by oxidative stress which seems closely related to inflammatory processes [1, 2]. Inflammation is the set of defense mechanisms by which the body recognize, destroy and eliminate all foreign substances. Inflammatory reaction sometimes exceeds its objectives leading to deleterious effects. It then needs to be managed. On the other hand, oxidative stress (due to increase of oxygen reactive species) is linked to many pathologies [3, 2, 1]. As implication of oxidative stress and inflammation in occurrence of several pathologies (diabetes, cancer, cardiovascular diseases) was highlighted [3-5] search for molecules with antioxidant and anti-inflammatory power now goes beyond the anti-aging or cosmetic framework. Therefore, during two past decades, scientific research focused on them worldwide. In Africa and many low and middle income countries, traditional knowledge based on medicinal plants is used to fight against oxidative stress and inflammation [6]. Resort to this form of medicine have been linked to cultural and economic reasons [7, 8]. However, we note a worldwide increase of medicinal plants use [9, 10] because of their renewable character and association with no side effects. It is then important to investigate the effectiveness of those medicines. This is the purpose of this study focused on three plants recurrent in Benin traditional medicine: *Dialium guineense* Willd., *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. Ex Benth., and *Tamarindus indica* L.. Valorization and safeguarding of those threatened plants in Benin [11, 12] and their recurrence in our ethnobotanical survey justify our choice on them. They belong to the Fabaceae family which is well know for its medicinal purposes [13-16].

Their aerial organs are widely used in the treatment of various infectious diseases in Benin. Because inflammatory reaction may occur in response to infections, natural compounds having both activities would be very interesting.

D. guineense is a dialioideae exclusively present in regions of tropical Africa and exceptionally in Sao Tome et Principe. It grows mainly in the wild as a shrub on land left fallow and in dry or dense forests, as well as forest galleries, from Senegal to southern Nigeria. In Benin, it is present from the coast to the southern region. Antibiotic properties are attributed to its roots, leaves and barks used alone or in combination with other plants in the treatment of malaria, coughs, bronchitis, diarrhea, palpitations, dysmenorrhea, ulcer, anemia, hemorrhoids [17, 18]. Concerning *P. biglobosa*, it is a Mimosoideae [19] present in tropical Africa between 3 ° and 15 ° North. It grows in tropical regions with high rainfall but also in arid environments. In Benin, it is an almost ubiquitous tree occupying the fifth position among the most used plants in traditional medicine [20]. Finally, *T. indica* is a detarioideae up to 25 meters tall [21] growing very well in semi-humid or arid regions [22]. With well known laxative and carminative effects, its organs are used in the treatment of a wide range of pathologies such as toothaches [23], bacterial infections, malaria [24].

Material and Methods

Leaves and bark of the plants were collected in three localities of Benin (Abomey-Calavi, Cotonou and Parakou). Samples were formally identified at the Benin National Herbarium under the voucher numbers AA 6727 / HNB, AA 6728 / HNB and AA 6729 / HNB for *Dialium guineense* Willd., *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. Ex Benth., and *Tamarindus indica* L. respectively.

RAW 264.7 macrophage assay has been used to monitor the inhibitory effects of the extracts on the low-grade inflammatory cascade (RAW 264.7, Sigma-Aldrich, N° P6110401, Lot. 09I006). Phototoxicity was assessed using Balb / c 3T3 mouse fibroblasts (3T3-L1) (ATCC, United States, ATCC® CL-173™, N° P6110401, Lot. 09I006). DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium) with stable L-glutamine supplemented with Penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100 µg/ml, and 10% of inactivated calf serum served as culture medium. It was freshly prepared with a pH of 7.2. Standardized horse blood was used for KRL test. All test materials were diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich).

Anti-inflammatory test and cell viability

This *in vitro* anti-inflammatory assay is based on the ability of macrophages to generate a strong inflammatory response when stimulated with antigens. Mouse immortalized macrophages (RAW 264.7 cell line) were stimulated by *E. coli* LPS and exposed to the extracts for 24 hours. At the end of the incubation period, NO production was evaluated indirectly by measuring the accumulation of nitrite/nitrate in the culture medium using a spectrophotometric method based on the Griess reaction. Negative and positive controls were DMSO and Dexamethasone (1, 5, 10, 50 and 100 µM) respectively. Cell mitochondrial respiration measurement allowed to assess cell viability. Inhibition of NO release and inhibition of cell viability were expressed as percentages as compared to the negative controls:

$$\text{Percentage of NO release (\%)} = 100 \times (\text{OD}_{\text{test well}} - \text{OD}_{\text{blank}}) / (\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank}})$$

$$\text{Percentage of Cell viability (\%)} = 100 \times (\text{OD}_{\text{test well}} - \text{OD}_{\text{blank}}) / (\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank}})$$

The concentrations of the test material causing respectively a 50% decrease of NO release (IC_{50-NO release}) and a 50% decrease of cell viability (IC_{50-cell viability}) were calculated using the software Table curve Version 2.0. The anti-inflammatory ratio corresponded to the ratio between the anti-inflammatory activity and the toxicity. It was expressed as follows:

$$\text{Anti-inflammatory ratio} = \text{IC}_{50\text{-cell viability}} / \text{IC}_{50\text{-NO release}}$$

Phototoxicity and cytotoxicity measurement

The *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test was used to evaluate phototoxicity of the six ethanolic extracts measuring relative reduction in viability of cells exposed to them in presence of light versus absence of light. The Photo-Irritation-Factor (PIF) was calculated with concentrations (obtained by the software Phototox Version 2.0.) of the test material causing a 50% release of the preloaded Neutral Red without irradiation (IC₅₀ -Irr) and with irradiation (IC₅₀ +Irr) as compared to the control culture using the following formula:

$$\text{PIF} = \text{IC}_{50} (-\text{Irr}) / \text{IC}_{50} (+\text{Irr})$$

On the other hand, the degree of membrane damage (i.e. the increase of released Neutral Red) was measured by a fluorescence-luminescence reader Infinite M200 Pro (TECAN). The Optical Density (OD) of each well was read at 540 nm. The results obtained for wells treated with the test material were compared to those of untreated control wells (HBSS, 100% viability) and converted to percentage values. Neutral Red desorbed solution serves as blank.

The percentages of cell viability were calculated as:

$$\text{Viability (\%)} = \frac{\text{Mean OD of test wells} - \text{mean OD of blanks}}{\text{Mean OD of negative control} - \text{mean OD of blanks}}$$

Kit Radicaux Libres (KRL) test

Evaluation of the overall resistance of standardized horse blood submitted to oxygen reactive species attack was made in absence versus presence of our extracts. The overall resistance of the control blood to the radical attack in the presence or absence of our products was expressed by the time at which 50% of the blood cells were lysed (T1 / 2 in minutes). The antiradical efficacy of the products was then expressed as a percentage of overall potential for antiradical defense of the control blood (% T1 / 2 of the control blood). The results were standardized in Trolox equivalents (water soluble analogue of vitamin E) and in equivalents Gallic acid (phenolic acid).

Gas chromatography and mass spectrometry analysis

100µl of each filtered extract were dried with nitrogen, then 100µl of BSTFA were added and the whole is incubated at 70 °C for 20 min. 2µl were injected for GC-MS analysis. The analyses were carried with a GC-MS apparatus consisting of a chromatograph Shiwazu QP, a mass spectrometer GCMS-QP2010S equipped with an electronic impact ion source and a quadrupole analyzer type, a GC Solution acquisition software as well as banks (NIST, WILEY). The compounds were separated using a DB-1MS capillary column (30 m x 0.25 x mm internal diameter x 0.25 µm film thickness from JW Scientific) which temperature limits were between -60 °C and 350 °C. The mobile phase was helium. Pressure in the column

was 3psi and the flow rate was 1.59 mL /min. The injector temperature (Inlet) was 280 °C, interface temperature was 280 °C, the source and the quadrupole at 150 °C. Temperature gradient was programmed as follows: 1 min at 60 °C, then increasing from 100 to 260 °C at 4 ° / min, then 30 min at 260

°C. The total elution time was 82 min. We focus on compounds with high retention time (>60min) in this work.

Results and Discussion

Results of anti-inflammatory activities and phototoxicity are reported in Tables 1&2 below.

Table 1: Anti-inflammatory, cytotoxic activity and anti-inflammatory ratio of the extracts

	NO release IC ₅₀ (µM or µg/mL)	Cell viability IC ₅₀ (µM or µg/mL)	Anti-inflammatory ratio
<i>Dialium guineense</i> barks	0.15 ± 0.01	68.74	458.2
<i>Dialium guineense</i> leaves	0.22 ± 0.05	43.17 ± 8.2	196.2
<i>Parkia biglobosa</i> barks	77.78 ± 9.4	>100	>1.3
<i>Parkia biglobosa</i> leaves	0.62 ± 0.08	>100	>161
<i>Tamarindus indica</i> barks	0.28 ± 0.02	48.91 ± 10.1	174.6
<i>Tamarindus indica</i> leaves	>100	>100	-
Dexamethasone	4.31 ± 1.45 µM	163.22 ± 24.96 µM	37.87

Extracts of *Dialium guineense* (both leave and stem), those of leaves of *Parkia biglobosa* and barks of *Tamarindus indica* exert higher anti-inflammatory activity than Dexamethasone, the positive control (Fig. 1). Barks of *Dialium guineense* extract showed the best anti-inflammatory activity (Table 1). Sitosterol (0.77%) and lupeol acetate (0.55%) are triterpenoids we found and reported for the first time in this extract. Those two molecules have been reported to have interesting anti-inflammatory activity [25, 26]. In association with phenolic compounds contained in this extract [27-29] they could explain our result and support the use of *Dialium*

guineense by traditional healers. This extract has a high photo-irritation factor (Table 2). Therefore, it appears suitable to investigate the three others as anti-inflammatory drugs for cutaneous use. The leaves of this plant for example have half of the anti-inflammatory activity compared to the barks but is not phototoxic. It has higher tenor of sitosterol (3.5%) and lupeol acetate (1.7%) which seems to play a key role in phototoxicity as they are also more abundant in leaves of *P. biglobosa* (2.02% and 4.41%) and barks of *T. indica* (0.80% and 1.53%) (Tables 7&8).

Table 2: Phototoxicity results

	Toxicity in non-irradiated cells IC ₅₀ (-irr) (µM)	Toxicity in irradiated cells IC ₅₀ (+irr) (µM)	PIF	Phototoxicity
<i>Dialium guineense</i> barks	75.31 ± 8.54	8.97 ± 1.54	8.39	phototoxic
<i>Dialium guineense</i> leaves	47.56 ± 9.64	36.87 ± 4.21	1.28	Not phototoxic
<i>Parkia biglobosa</i> barks	130.85 ± 9.21	202.78 ± 9.47	0.64	Not phototoxic
<i>Parkia biglobosa</i> leaves	123.61 ± 2.21	66.33 ± 1.34	1.86	Not phototoxic
<i>Tamarindus indica</i> barks	53.64 ± 8.88	49.94 ± 9.54	1.07	Not phototoxic
<i>Tamarindus indica</i> leaves	8.76 ± 9.47	>100	-	Not phototoxic
Chlorpromazine	46.33 ± 2.96	1.04 ± 0.25	44.54	phototoxic

-irr: not irradiated, +irr: irradiated

It clearly appears on Figure 1 that, despite its great anti-inflammatory activity, only *Dialium guineense* barks extract exerted phototoxicity in our study. Leaves extract of this plant have lower anti-inflammatory activity than barks but are not phototoxic. This can be due to the difference of abundance in

terpenoids like sitosterol (0.78% vs trace) and lupenone (0.42% vs trace). *Parkia biglobosa* leaves and *Tamarindus indica* barks extracts also aren't phototoxic and have higher amount of sitosterol, lupeol or lupenone than *Dialium guineense* barks extract.

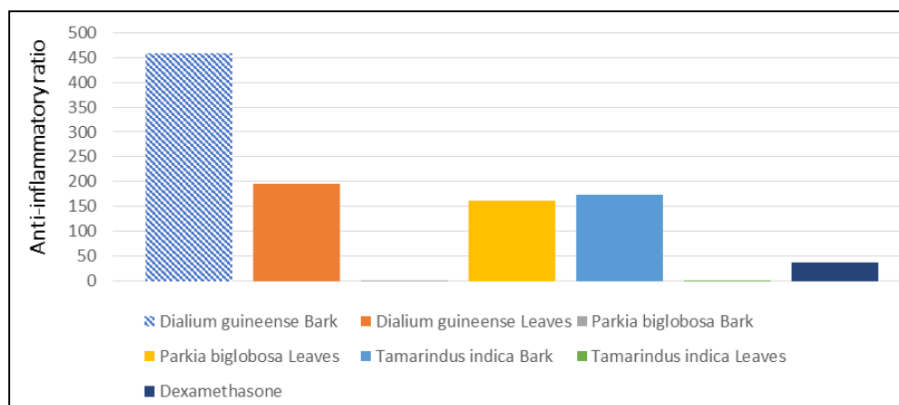


Fig 1: Anti-inflammatory activity and phototoxicity of ethanolic extracts

Table 3: antioxidant activity of the extracts

Concentrations (mg/L) *	% increase of half-hemolysis time (T _{1/2}) of control blood					
	<i>Dialium guineense</i>		<i>Parkia biglobosa</i>		<i>Tamarindus indica</i>	
	Barks	leaves	Barks	leaves	Barks	leaves
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	5.64	3.64	6.94	7.30	21.87	10.93
2	15.85	5.39	9.83	14.08	38.19	20.34
5	36.70	13.63	19.65	30.63	73.14	45.10
10	61.33	20.98	30.72	59.86	118.05	75.95
20	82.93	36.80	47.83	109.48	265.36	117.55
50	149.18	73.47	106.94	266.33	451.18	224.66
100	438.64	85.30	277.53	181.70	342.87	338.91

* Concentration in mg of extract per liter of reaction medium

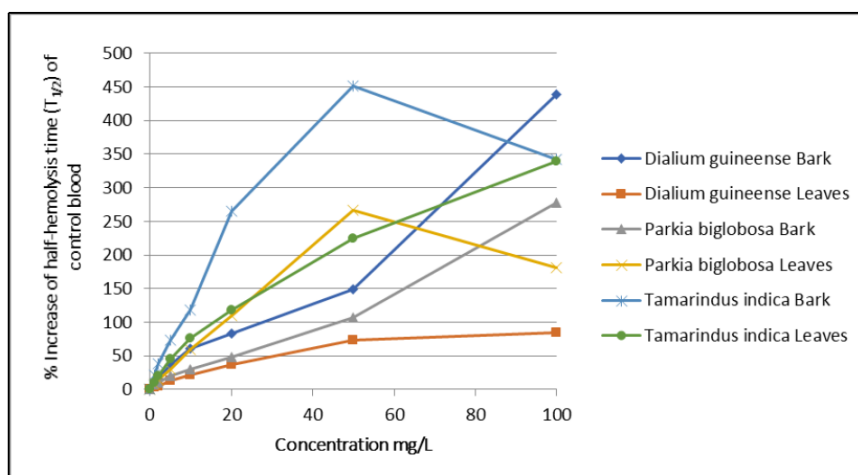


Fig 2: Antioxidant activity of plant extracts

KRL test results indicate that all the tested plant extracts have a dose-dependent antiradical capacity (Fig. 2) and this antioxidant power is strongly increasing in a concentration range of 0 to 20 mg/L (Table 3). At 20 mg/L, leaves of *Parkia biglobosa*, leaves and barks of *Tamarindus indica* extracts

have remarkable results. They increased the resistance of the control blood to a radical attack up to 109.48, 265.36 and 117.55% respectively (Table 3). Also, those extracts were at least as effective as Trolox and gallic acid.

Table 4: Anti-radical power of extracts vs Trolox (Equivalent Trolox mg / g product)

Concentrations (mg/L) *	Antioxidant activity of plant extracts of Benin: Equivalents mg of Trolox/g of extract					
	<i>Dialium guineense</i>		<i>Parkia biglobosa</i>		<i>Tamarindus indica</i>	
	Barks	leaves	Barks	leaves	Barks	leaves
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	2157,55	1391,50	2654,27	2789,66	8360,74	4177,09
2	3028,74	1029,43	1879,17	2689,96	7297,49	3887,81
5	2805,47	1041,60	1502,12	2341,37	5591,19	3447,83
10	2344,19	802,04	1174,09	2287,81	4512,03	2902,86
20	1584,90	703,19	914,09	2092,13	5071,12	2246,38
50	1140,39	561,58	817,49	2035,83	3448,87	1717,37
100	1676,51	326,03	1060,73	694,48	1310,49	1295,33

Table 5: Anti-radical power of extracts vs Gallic acid (Equivalent Trolox mg / g product)

Concentrations (mg/L) *	Antioxidant activity of plant extracts of Benin: Equivalents mg of Gallic acid/g of extract					
	<i>Dialium guineense</i>		<i>Parkia biglobosa</i>		<i>Tamarindus indica</i>	
	Barks	leaves	Barks	leaves	Barks	leaves
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	1027,26	662,53	1263,76	1328,22	3980,74	1988,81
2	1442,05	490,14	894,72	1280,75	3474,50	1851,08
5	1335,75	495,93	715,19	1114,78	2662,09	1641,59
10	1116,12	381,87	559,01	1089,28	2148,28	1382,12
20	754,61	334,80	435,22	996,11	2414,48	1069,55
50	542,96	267,38	389,23	969,31	1642,08	817,68
100	798,22	155,23	505,04	330,66	623,96	616,74

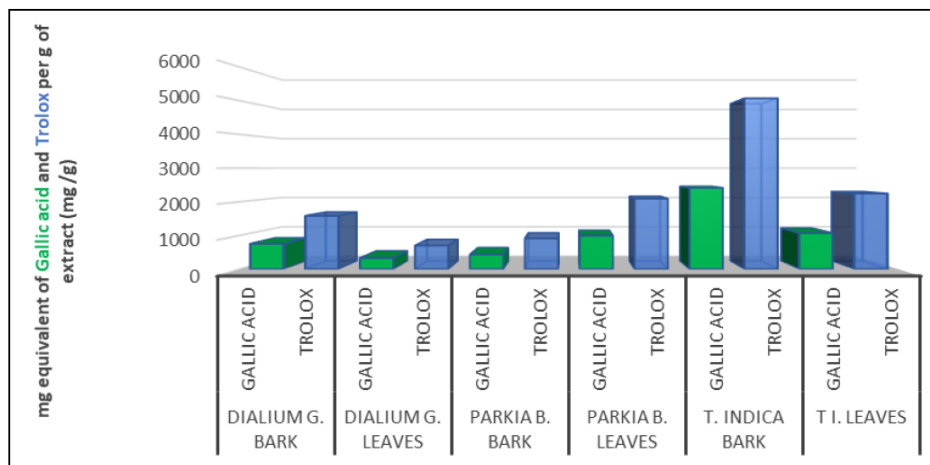


Fig 3: Comparison of the antioxidant power of the extracts with Gallic acid and Trolox at a concentration of 20 mg/L

As shown in Fig. 3, *Tamarindus indica*'s barks ethanolic extract is particularly interesting: it is five times more active than Trolox (Table 4) and 2.5 times more active than gallic acid (Table 5). Lupeol (0.83%), amyirin (0.65%) and lupeol acetate (1.53%) were detected in this extract by GC-MS analysis (Table 8). Those molecules were reported in the plant [30] and their free radical scavenging property is well known [31-33]. Leaves extract of this plant also showed high free radical scavenging activity [34, 35].

Chemical compounds identified by GC-MS in the extracts are summarized below. Identification was based on direct comparison and at least 80% matching of the retention times and mass spectral data with those in the National Institute of Standards and Technology (NIST) and WILEY libraries. DPPH free radical scavenging test of the methanolic extract of *Dialium guineense* leaves showed a concentration-dependent antioxidant activity supposed to be due to the phenolics compounds [36]. Leaves ethanolic extracts of *Parkia biglobosa* showed an antioxidant activity of 109.48% according to the KRL test. It contains lupenone (2.59%), β -Amyrin (1.05%), Sitosterol (2.02%) and lupeol acetate (4.41) all known for biologic activities. Other studies reported similar antiradical activity of the barks according to Diphenyl Picryl Phenyl Hydrazine (DPPH) test: 87.68% for aqueous extract [37].

Table 6: Triterpenoids identified in *Dialium guineense* by GC-MS

		Leaves	Stem-barks
RT	Compounds	5.92 %	1.48 %
61.774	Free Sitosterol	0.78	trace
62.337-62.442	Stigmasterol TMS	0.26	0.2
63.086	Lupenone	0.42	-
63.794-63.873	Lupeol	trace	trace
64.603-64.838	Sitosterol TMS	2.72	0.77
66.108-66.433	Lupeol acetate	1.74	0.51

RT: Retention time

Sitosterol and lupeol acetate are reported here for the first time in those extracts. Despite their low amount, we suppose they contribute to the anti-inflammatory role and the antioxidant activities of the extracts as reported by several papers [38, 25, 33].

Table 7: Triterpenoids identified in *Parkia Biglobosa* by GC-MS

		Leaves	Stem-barks
RT	Compounds	10.44%	7.31%
60.665	Taraxerone	-	0.66
62.372-62.442	Stigmasterol TMS	0.37	0.72
62.883-63.086	Lupenone	2.59	1.14
63.840-63.873	Lupeol	trace	trace
64.457	beta-Amyrin TMS	1.05	-
64.636	beta-Sitosterol	-	1.18
64.838	Sitosterol TMS	2.02	-
66.196-66.433	Lupeol acetate	4.41	3.61

Beta-Amyrin is present in *Parkia Biglobosa* leaves extract which is as active as gallic acid and two times more active than Trolox (Fig. 3). It is well known for its antioxidative and anti-inflammatory activities [39, 40].

Table 8: Triterpenoids identified in *Tamarindus indica* by GC-MS

		Leaves	Stem-barks
RT	Compounds	4.04%	3.81%
62.25	Alpha-Amyrin TMS	-	0.23
62.316 & 62.385	Stigmasterol TMS	trace	trace
62.869 & 63.023	Lupenone	1.75	trace
63.817	Lupeol	-	0.83
64.345	beta-Amyrin TMS	-	0.42
64.612	beta-Sitosterol	-	0.80
64.724	Sitosterol TMS	1.07	-
66.138 & 66.219	Lupeol acetate	1.22	1.53

Lupeol, beta amyirin and beta sitosterol could be involved in the good antioxidant and anti-inflammatory activity of *Tamarindus indica* barks extract. This extract is five times more active than Trolox and two times more active than gallic acid (Fig 3).

Conclusion

In the present study, ethanolic extracts of leaves and barks of *Dialium guineense*, *Parkia biglobosa* and *Tamarindus indica*, showed interesting antioxidant and anti-inflammatory properties. Lupeol acetate and Sitosterol were reported for the first time in *Dialium guineense* barks. Lupenone, amyirin, stigmasterol and taraxerone were also identified in the extracts and could explain their biological activity. The amounts of those compounds and their synergy also seem to play a key role in the biological activities. Except barks

extracts of *Dialium guineense* which is phototoxic, the other extracts can be investigate as cosmetic agents.

Abbreviations

DMSO: Dimethyl sulfoxide
DPPH: Diphenyl Picryl Phenyl Hydrazine
KRL: Kit Radicaux Libres
LPS: Lipopolysaccharide
PIF: Photo-Irritation-Factor

Declarations

- **Ethics approval and consent to participate:** Not applicable.
- **Consent to publish:** Not applicable
- **Availability of data and materials:** All data generated or analyzed during this study are included in this published article (However, raw data are available from the corresponding author on reasonable request).
- **Competing interests:** “The authors declare that they have no competing interests.”
- **Funding:** France and Benin governments
- Authors' Contributions

S.M.G. is corresponding author, PhD student working on the subject. He carried out most of the test and wrote this manuscript. S. A. performed KRL tests, figures and tables. L. A. make GC-MS analyzes. C.D.G. performed anti-inflammatory tests. M.R. make extractions and assisted L.A for GC-MS analyzes. E.D.A. is PhD supervisor and direct and correct this manuscript. P.P. is co- Supervisor of thesis. He also direct and correct the manuscript. D.C.S is member of thesis committee and he correct the manuscript.

All authors read and approved the final manuscript for submission. They have no conflict of interest to declare.

- **Acknowledgements:** Authors are grateful for Caroline ORNETO for her technical support and for Mr. for his english language support.

References

1. Salzano S. *et al.* Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2014; 111(33):12157-12162.
2. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. “Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?,” *Free Radic. Biol. Med.* 2010; 49(11):1603-1616
3. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. “Chronic Inflammation and Oxidative Stress as a Major Cause of Age- Related Diseases and Cancer,” *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 2009; 3(1):73-80.
4. Eiró N, Vizoso FJ. Inflammation and cancer,” *World J. Gastrointest. Surg.* 2012; 4(3):62-72.
5. Golbidi S, Badran M, Laher I. Antioxidant and anti-inflammatory effects of exercise in diabetic patients,” *Exp. Diabetes Res.*, 2012; 941868, 2012.
6. Adebayo SA, Dzoyem JP, Shai LJ, Eloff JN. “The anti-inflammatory and antioxidant activity of 25 plant species used traditionally to treat pain in southern African,” *BMC Complement. Altern. Med.* 2015; 15:159
7. Sato A. “Revealing the popularity of traditional medicine in light of multiple recourses and outcome measurements from a user’s perspective in Ghana, *Health Policy Plan.* 2012; 27(8):625-637.
8. Oyebo O, Kandala NB, Chilton PJ, Lilford RJ. Use of traditional medicine in middle-income countries: a WHO-SAGE study,” *Health Policy Plan.* 2016; 31(8):984-991.
9. Tilburt JC, Kaptchuk TJ. Herbal medicine research and global health: an ethical analysis,” *Bull. World Health Organ.* 2008; 86(8):594-599.
10. Ekor M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety, *Front. Pharmacol.* 2014; 4:177.
11. Meregin AOA. Some endangered plants producing edible fruits and seeds in Southeastern Nigeria,” *Fruits*, 2005; 60(3):211-220.
12. Lykke AM. Local perceptions of vegetation change and priorities for conservation of woody-savanna vegetation in Senegal,” *J Environ. Manage.* 2000; 59(2):107-120.
13. Rosado-Vallado M, Brito-Loeza W, Mena-Rejón G, Quintero-Marmol E, Flores-Guido J. “Antimicrobial activity of Fabaceae species used in Yucatan traditional medicine,” *Fitoterapia.* 2000; 71(5):570-573.
14. Koné W, Atindehou KK, Terreaux C, Hostettmann K, Traoré D, Dosso M. Traditional medicine in North Côte-d’Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity, *J. Ethnopharmacol.* 2004; 93(1):43-49.
15. Ma X, Zheng C, Hu C, Rahman K, Qin L. “The genus *Desmodium* (Fabaceae)-traditional uses in Chinese medicine, phytochemistry and pharmacology, *J. Ethnopharmacol.*, 2011; 138(2):314-332.
16. Rahman AM, Parvin MIA. Study of medicinal uses on Fabaceae family at Rajshahi, Bangladesh,” *Res. Plant Sci.* 2014; 2(1):6-8.
17. Odukoya OA, Houghton PJ, Adelusi A, Omogbai EKI, Sanderson L, Whitfield PJ. Molluscicidal triterpenoid glycosides of *Dialium guineense*, *J. Nat. Prod.* 1996; 59(6):632-634.
18. Bero J, *et al.*, *In vitro* antiplasmodial activity of plants used in Benin in traditional medicine to treat malaria,” *J. Ethnopharmacol.* 2009; 122(3):439-444.
19. Hopkins HC. The taxonomy, reproductive biology and economic potential of *Parkia* (Leguminosae: Mimosoideae) in Africa and Madagascar,” *Bot. J. Linn. Soc.* 1983; 87(2):135-167.
20. Eyog Matig O, Adjanohoun E, de Souza S, Sinsin B. Programme de Ressources Genetiques Forestieres en Afrique au Sud du Sahara (*Programme saforgen*). Bioversity International, 2001.
21. Tariq M, Chaudhary SS, Rahman K, Zaman HR, Shaikh I. *Tamarindus Indica*: AN Overview,” *J Biol. Sci. Opin.*, 2013; 1(2):128-131.
22. Meher B, Dash DK, Roy A. A review on: Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of *Tamarindus indica* L,” *World J Pharm Pharm. Sci.* 2014; 3(10):229-240.
23. Tapsoba H, Deschamps JP. Use of medicinal plants for the treatment of oral diseases in Burkina Faso,” *J. Ethnopharmacol.* 2006; 104(1, 2):68-78.
24. Doughari JH. Antimicrobial activity of *Tamarindus indica* Linn,” *Trop. J. Pharm. Res.* 2006; 5(2):597-603.
25. Loizou S, Lekakis I, Chrousos GP, Moutsatsou P. “ β -Sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells,” *Mol. Nutr. Food Res.* 2010; 54(4):551-558.
26. Lucetti DL, *et al.*, “Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated

- from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel,” J. Inflamm. 2010; 7(1):60.
27. Orji. “Antibacterial Activities of Crude Leaf and Bark Extracts of ‘Icheku’ *Dialium guineense* on Bacterial Isolates from Bronchitis Patients,” IOSR J. Pharm. Biol. Sci., 2012; 1(3):21-25.
 28. Olajubu F, Akpan I, Ojo DA, Oluwalana S. Antimicrobial potential of *Dialium guineense* (Wild.) stem bark on some clinical isolates in Nigeria,” Int. J. Appl. Basic Med. Res. 2012; 2(1):58-62.
 29. Obonga W, Nnadi C, Agbo M, Kenechukwu F, Nwodo U. Distribution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Apparently Healthy Population and its Susceptibility to Saponins from *Dialium guineense*,” Br. J. Pharm. Res. 2014; 4(18):2200-2209.
 30. Jain A, Bhadoriya S, Ganeshpurkar A, Narwaria J, Rai G. *Tamarindus indica*: Extent of explored potential,” Pharmacogn. Rev., 2011; 5(9):73.
 31. Santiago LA, Mayor ABR. Lupeol: An antioxidant triterpene in *Ficus pseudopalma* Blanco (Moraceae),” Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2014; 4(2):109-118.
 32. Tchimene MK, Nwaehujor CO, Ezenwali M, Okoli CC, Iwu M. “Free Radical Scavenging Activity of Lupeol Isolated from the Methanol Leaf Extract of *Crateva adansonii* Oliv. (Capparidaceae),” 2016; 8(3):8
 33. Parvez MK, Alam P, Arbab AH, Al-Dosari MS, Alhowiriny TA, Alqasoumi SI. “Analysis of antioxidative and antiviral biomarkers β -amyrin, β -sitosterol, lupeol, ursolic acid in *Guiera senegalensis* leaves extract by validated HPTLC methods,” Saudi Pharm. J. 2018.
 34. Razali N, Abdul Aziz A, Lim CY, Mat Junit S. “Investigation into the effects of antioxidant-rich extract of *Tamarindus indica* leaf on antioxidant enzyme activities, oxidative stress and gene expression profiles in HepG2 cells,” Peer J, 2015; 3:e1292.
 35. Razali N, Mat Junit S, Ariffin A, Ramli NSF, Abdul Aziz A. Polyphenols from the extract and fraction of *T. indica* seeds protected HepG2 cells against oxidative stress,” BMC Complement. Altern. Med., 2015; 15:438.
 36. Ogu GI, Ezeadila J, Ehiobu JM. Antioxidant and antimicrobial activities of *Dialium guineense* (Willd) leaf extract,” Pharm Pharmacol Res. 2013; 1(1):1-7.
 37. Olabinri BM, Adetutu A, Olaleye MT, Oluwafunsho BO, Oyeniyi OO. A study of the antioxidative potentials of acetone and aqueous extracts of *Parkia biglobosa* and *Tetracarpidium conophorum* stem barks *in vitro*,” Int. J. Med. Med. Sci. 2013; 5(8):368-373.
 38. Awad AB, Burr AT, Fink CS. Effect of resveratrol and β -sitosterol in combination on reactive oxygen species and prostaglandin release by PC-3 cells,” Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids, 2005; 72(3):219-226.
 39. Hernandez L, Palazon J, Navarro-Oca A. “The Pentacyclic Triterpenes α , β -amyryns: A Review of Sources and Biological Activities,” in *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, V. Rao, Ed. In Tech, 2012.
 40. Krishnan K, Mathew LE, Vijayalakshmi NR, Helen A. “Anti-inflammatory potential of β -amyryn, a triterpenoid isolated from *Costus igneus*,” Inflammopharmacology, 2014; 22(6):373-385.

ANNEXE 4 : POSTER TURIN-2018

Neuroprotective Activity of AT000: A Plant Extract Derived from Traditional Chinese Medicine



Samy ISKANDAR^{1,2}, Maxime ROBIN¹, Philippe PICERELLE¹, Laurent MOY^{2*}

¹ IMBE-UMR CNRS 7263 - IRD237 : Laboratoire de Pharmacie Galénique, Faculté de Pharmacie, Université Aix-Marseille, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 5, France
² Aroma Therapeutics, Europarc Sainte Victoire - Bât 6 - Route Valbrillant, 13590 Meyreuil, France
 * Corresponding author: moy@aromatherapeutics.fr



Introduction

Alzheimer's disease (AD) is an incurable neurodegenerative disease of cerebral tissue that leads to progressive and irreversible loss of mental functions. Evidences suggest that the neurodegenerative process occurring in (AD) can be due to the interaction of soluble oligomeric forms of β -amyloid peptide (A β O) with binding targets, hyperphosphorylation of tau protein, caspase activation, loss of synapse, neuronal death, generation of reactive intermediates of oxygen (Callizot et al., 2013).

AROMA THERAPEUTICS develops a plant extract that could be protective against A β neurotoxicity. The aim of this study was:

- To determine whether AT000 can alleviate the pathology induced in mice injected i.c.v. with A β_{25-35} (spontaneous alternation in the Y-maze, passive avoidance test and lipid peroxidation in the hippocampus).
- To evaluate the effects of AT00X (modified recipe of AT000) in rat primary cortical neurons injured with A β_{1-42} . The neuronal survival as well as the protection of the neurite network was studied. In addition, the effect of the compound on the ROS generation was evaluated.

Materials and Methods

In vitro

Culture of cortical neurons: Rat cortical neurons were cultured as described by Callizot et al., 2013. The cells were seeded at a density of 20,000 per well in 96-well plates pre-coated with poly-L-lysine and cultured at 37 °C in an air (95 %) - CO₂ (5 %) incubator.

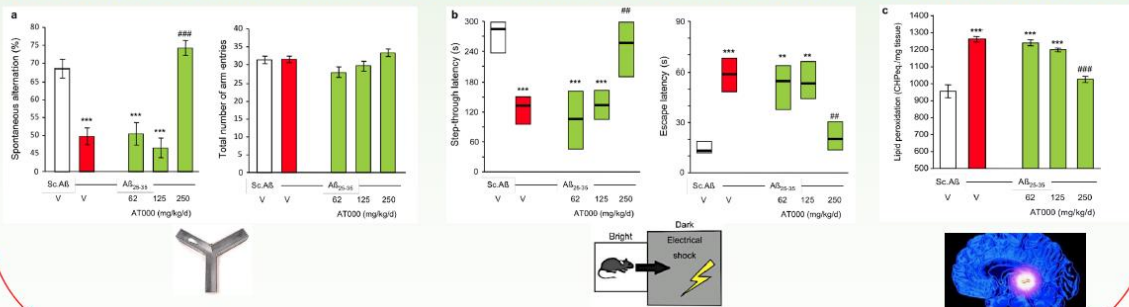
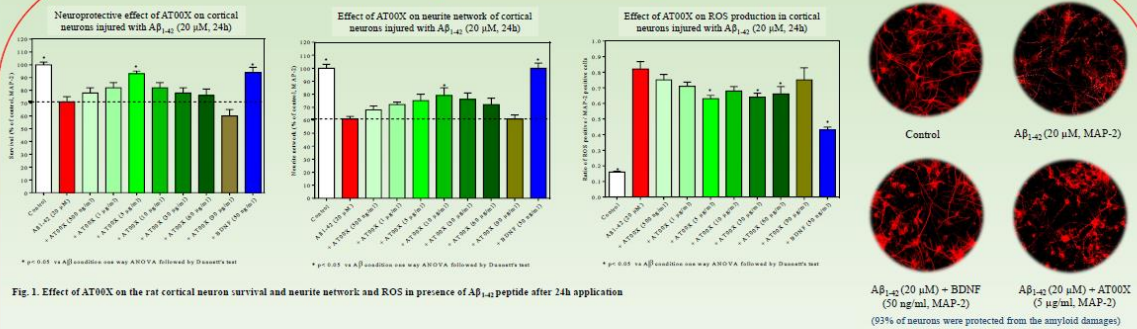
Test compounds: The cortical neurons were intoxicated with A β solution (20 μ mol/L) after 11 days of culture. AT00X and BDNF (50 ng/ml) were solvated in culture medium and then pre-incubated with primary cortical neurons for 1 hour before the A β_{1-42} application.

Immunostaining: The cortical neurons were washed again twice in PBS, and then were permeabilized and non-specific sites were blocked with a solution of PBS containing 0.1% of saponin and 1% FCS for 15 min at room temperature. The cells were incubated with polyclonal anti microtubule-associated-protein 2 (MAP-2). That was revealed with Alexa Fluor 568 goat anti-chicken IgG. Nuclei of neurons were labeled by a fluorescent marker (Hoechst solution).

In vivo

AT000 was administered *per os* by gavage twice-a-day (b.i.d.), starting 14 days before A β_{25-35} injection and lasting until day 7 when animals were examined behaviorally (21-days injection). 3 doses were tested: 62, 125 and 250 mg/kg/day. On day 9, immediately after the retention session, animals were sacrificed by decapitation and the hippocampus and cortex dissected out. Lipid peroxidation in the hippocampus was analyzed.

Results



Conclusions

- AT000 treatment prevented the A β_{25-35} -induced deficits at the highest dose tested with a highly significant effect.
- AT000 treatment alleviated the A β_{25-35} -induced deficits, with a significant prevention at the highest dose tested on both step-through latency/escape latency parameter.
- AT000 treatment dose-dependently attenuated the A β_{25-35} -induced increase in lipid peroxidation, with a significant and complete blockade at the highest doses tested.
- AT00X showed a significant effect on neuron survival at 5 μ g/ml. In addition, a significant protective effect was observed on the neurite network at 10 μ g/ml.
- AT00X added 1h before the peptide application, was able to reduce the ROS generation in neurons (~25 % of reduction), the effect was significant for 5, 30 and 60 μ g/ml.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, N.J. (2004). Prediction of blood–brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and in silico models. *Drug Discov. Today Technol.* *1*, 407–416.
- Abbott, N.J., and Romero, I.A. (1996). Transporting therapeutics across the blood-brain barrier. *Mol. Med. Today* *2*, 106–113.
- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 41–53.
- Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol. Dis.* *37*, 13–25.
- Aguirre, E., Woods, R.T., Spector, A., and Orrell, M. (2013). Cognitive stimulation for dementia: A systematic review of the evidence of effectiveness from randomised controlled trials. *Ageing Res. Rev.* *12*, 253–262.
- Alam, M.N., Bristi, N.J., and Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm. J.* *21*, 143–152.
- Alamed, J., Chaiyasit, W., McClements, D.J., and Decker, E.A. (2009). Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *J. Agric. Food Chem.* *57*, 2969–2976.
- Albert, M.S., DeKosky, S.T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H.H., Fox, N.C., Gamst, A., Holtzman, D.M., Jagust, W.J., Petersen, R.C., et al. (2011). The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer’s disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement.* *7*, 270–279.
- Alzheimer, A., Stelzmann, R.A., Schnitzlein, H.N., and Murtagh, F.R. (1995). An English translation of Alzheimer’s 1907 paper, “Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde.” *Clin. Anat. N. Y.* *N 8*, 429–431.
- Ambavade, S.D., Mhetre, N.A., Muthal, A.P., and Bodhankar, S.L. (2009). Pharmacological evaluation of anticonvulsant activity of root extract of *Saussurea lappa* in mice. *Eur. J. Integr. Med.* *1*, 131–137.
- Anstey, K.J., von Sanden, C., Salim, A., and O’Kearney, R. (2007). Smoking as a Risk Factor for Dementia and Cognitive Decline: A Meta-Analysis of Prospective Studies. *Am. J. Epidemiol.* *166*, 367–378.
- Ardestani, A., and Yazdanparast, R. (2007). *Cyperus rotundus* suppresses AGE formation and protein oxidation in a model of fructose-mediated protein glycoxidation. *Int. J. Biol. Macromol.* *41*, 572–578.
- Ashton, P.S. (1988). Dipterocarp Biology as a Window to the Understanding of Tropical Forest Structure. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* *19*, 347–370.

- Bales, K.R., Verina, T., Dodel, R.C., Du, Y., Altstiel, L., Bender, M., Hyslop, P., Johnstone, E.M., Little, S.P., Cummins, D.J., et al. (1997). Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat. Genet.* *17*, 263–264.
- Banno, N., Akihisa, T., Yasukawa, K., Tokuda, H., Tabata, K., Nakamura, Y., Nishimura, R., Kimura, Y., and Suzuki, T. (2006). Anti-inflammatory activities of the triterpene acids from the resin of *Boswellia carteri*. *J. Ethnopharmacol.* *107*, 249–253.
- Barberger-Gateau, P., Raffaitin, C., Letenneur, L., Berr, C., Tzourio, C., Dartigues, J.F., and Alperovitch, A. (2007). Dietary patterns and risk of dementia: The Three-City cohort study. *Neurology* *69*, 1921–1930.
- Barbu, E., Molnàr, É., Tsibouklis, J., and Górecki, D.C. (2009). The potential for nanoparticle-based drug delivery to the brain: overcoming the blood–brain barrier. *Expert Opin. Drug Deliv.* *6*, 553–565.
- Barghorn, S., Nimmrich, V., Striebinger, A., Krantz, C., Keller, P., Janson, B., Bahr, M., Schmidt, M., Bitner, R.S., Harlan, J., et al. (2005). Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* *95*, 834–847.
- Barthelemy, P., Laforêt, J.P., Farah, N., and Joachim, J. (1999). Compritol® 888 ATO: an innovative hot-melt coating agent for prolonged-release drug formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* *47*, 87–90.
- Bateman, R.J., Xiong, C., Benzinger, T.L.S., Fagan, A.M., Goate, A., Fox, N.C., Marcus, D.S., Cairns, N.J., Xie, X., Blazey, T.M., et al. (2012). Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* *367*, 795–804.
- Battaglia, L., and Gallarate, M. (2012). Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* *9*, 497–508.
- Baumgart, M., Snyder, H.M., Carrillo, M.C., Fazio, S., Kim, H., and Johns, H. (2015). Summary of the evidence on modifiable risk factors for cognitive decline and dementia: A population-based perspective. *Alzheimers Dement.* *11*, 718–726.
- Becker, R.E., Greig, N.H., and Giacobini, E. (2008). Why Do So Many Drugs for Alzheimer's Disease Fail in Development? Time for New Methods and New Practices? *J. Alzheimers Dis.* *15*, 303–325.
- Begley, D.J. (2004). Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol. Ther.* *104*, 29–45.
- Bekris, L.M., Yu, C.-E., Bird, T.D., and Tsuang, D.W. (2010). Review Article: Genetics of Alzheimer Disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* *23*, 213–227.
- Benhaiem-Henry, K. (2017). Prise en charge de l'inflammation du côlon pour une stratégie thérapeutique innovante de la maladie de Crohn : formulation et développement de systèmes micro- et nanoparticulaires et squalénisation d'antioxydants extraits de végétaux. thesis. Aix-Marseille.

- Bensky, D., Gamble, A., and Kaptchuk, T.J. (1986). *Chinese herbal medicine: materia medica* (Seattle: Eastland Press).
- Bera, B., Guo, -R., Li, L., Zhao, W.H., Chen, Y.X., Wang, X., Fang, C.J., Feng, W., Zhang, T., Ma, X., et al. (2015). Nanoporous Silicon Prepared by Vapour Phase Strain Etch and Sacrificial Technique. p.
- Bernacki, J., Dobrowolska, A., Nierwińska, K., and Ma, A. (2008). Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol. Rep.* 23.
- Beydoun, M.A., Beydoun, H.A., Gamaldo, A.A., Teel, A., Zonderman, A.B., and Wang, Y. (2014). Epidemiologic studies of modifiable factors associated with cognition and dementia: systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 14, 643.
- Bickel, U., Yoshikawa, T., and Pardridge, W.M. (2001). Delivery of peptides and proteins through the blood–brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 247–279.
- Blasi, P., Giovagnoli, S., Schoubben, A., Ricci, M., and Rossi, C. (2007). Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 454–477.
- Blasi, P., Giovagnoli, S., Schoubben, A., Puglia, C., Bonina, F., Rossi, C., and Ricci, M. (2011). Lipid nanoparticles for brain targeting I. Formulation optimization. *Int. J. Pharm.* 419, 287–295.
- Blasi, P., Schoubben, A., Romano, G.V., Giovagnoli, S., Di Michele, A., and Ricci, M. (2013). Lipid nanoparticles for brain targeting II. Technological characterization. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 110, 130–137.
- Blondell, S.J., Hammersley-Mather, R., and Veerman, J.L. (2014). Does physical activity prevent cognitive decline and dementia?: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *BMC Public Health* 14, 510.
- Bown, D. (1995). *Encyclopedia of herbs & their uses* (London: Dorling Kindersley).
- Box, G.E.P., and Wilson, K.B. (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 13, 1–45.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, 25–30.
- Braskie, M.N., Klunder, A.D., Hayashi, K.M., Protas, H., Kepe, V., Miller, K.J., Huang, S.-C., Barrio, J.R., Ercoli, L.M., Siddarth, P., et al. (2010). Plaque and tangle imaging and cognition in normal aging and Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Aging* 31, 1669–1678.
- Brunsgaard, H. (2006). The clinical impact of systemic low-level inflammation in elderly populations. With special reference to cardiovascular disease, dementia and mortality. *Dan. Med. Bull.* 53, 285–309.
- Budson, A.E., and Price, B.H. (2005). Memory dysfunction. *N. Engl. J. Med.* 352, 692–699.
- Buhner, S.H. (2012). *Herbal antibiotics: natural alternatives for treating drug-resistant bacteria*.

- Burdock, G.A., and Carabin, I.G. (2008). Safety assessment of sandalwood oil (*Santalum album* L.). *Food Chem. Toxicol.* *46*, 421–432.
- Burt, S.A., and Reinders, R.D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* *36*, 162–167.
- Burton, P.S., Conradi, R.A., and Hilgers, A.R. (1991). (B) Mechanisms of peptide and protein absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *7*, 365–385.
- Butterfield, D.A., and Boyd-Kimball, D. (2004). Amyloid beta-peptide(1-42) contributes to the oxidative stress and neurodegeneration found in Alzheimer disease brain. *Brain Pathol. Zurich Switz.* *14*, 426–432.
- Cacabelos, R. (2007). Donepezil in Alzheimer's disease: From conventional trials to pharmacogenetics. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* *3*, 303–333.
- Callender, S.P., Mathews, J.A., Kobernyk, K., and Wettig, S.D. (2017). Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. *Int. J. Pharm.* *526*, 425–442.
- Callizot, N., Combes, M., Steinschneider, R., and Poindron, P. (2013). Operational dissection of β -amyloid cytopathic effects on cultured neurons. *J. Neurosci. Res.* *91*, 706–716.
- Camenisch, G., Alsenz, J., van de Waterbeemd, H., and Folkers, G. (1998). Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs' lipophilicity and molecular weight. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* *6*, 313–319.
- Candore, G., Colonna-Romano, G., Balistreri, C.R., Di Carlo, D., Grimaldi, M.P., Listì, F., Nuzzo, D., Vasto, S., Lio, D., and Caruso, C. (2006). Biology of longevity: role of the innate immune system. *Rejuvenation Res.* *9*, 143–148.
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A.B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., and Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytother. Res. PTR* *21*, 501–506.
- Chen, H.C., Chou, C.K., Lee, S.D., Wang, J.C., and Yeh, S.F. (1995). Active compounds from *Saussurea lappa* Clarks that suppress hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Res.* *27*, 99–109.
- Chevrier, M.R., Ryan, A.E., Lee, D.Y.-W., Zhongze, M., Wu-Yan, Z., and Via, C.S. (2005). *Boswellia carterii* extract inhibits TH1 cytokines and promotes TH2 cytokines in vitro. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* *12*, 575–580.
- Cho, J.Y., Baik, K.U., Jung, J.H., and Park, M.H. (2000). In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*. *Eur. J. Pharmacol.* *398*, 399–407.
- Choi, H.-G., Lee, D.-S., Li, B., Choi, Y.H., Lee, S.-H., and Kim, Y.-C. (2012). Santamarin, a sesquiterpene lactone isolated from *Saussurea lappa*, represses LPS-induced inflammatory responses via expression of heme oxygenase-1 in murine macrophage cells. *Int. Immunopharmacol.* *13*, 271–279.

- Chouraki, V., and Seshadri, S. (2014). Chapter Five - Genetics of Alzheimer's Disease. In *Advances in Genetics*, T. Friedmann, J.C. Dunlap, and S.F. Goodwin, eds. (Academic Press), pp. 245–294.
- Chumakov, I., Nabirotkin, S., Cholet, N., Milet, A., Boucard, A., Toulorge, D., Pereira, Y., Graudens, E., Traoré, S., Fouquier, J., et al. (2015). Combining two repurposed drugs as a promising approach for Alzheimer's disease therapy. *Sci. Rep.* 5, 7608.
- Combes, M., Poindron, P., and Callizot, N. (2015). Glutamate protects neuromuscular junctions from deleterious effects of β -amyloid peptide and conversely: An in vitro study in a nerve-muscle coculture: Interconnection Between Glutamate and A β on NMJs. *J. Neurosci. Res.* 93, 633–643.
- Contet, C., Goulding, S.P., Kuljis, D.A., and Barth, A.L. (2016). BK Channels in the Central Nervous System. *Int. Rev. Neurobiol.* 128, 281–342.
- Coppen, J.J. (1999). Benzoin: Production, Uses and International Trade. 24, 7.
- Coppens, J. (1995). Olibanum (frankincense), myrrh and opopanax resins and oils. *Flavours Fragr. Plant Orig.* 111.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923.
- Crane, P.K., Walker, R., Hubbard, R.A., Li, G., Nathan, D.M., Zheng, H., Haneuse, S., Craft, S., Montine, T.J., Kahn, S.E., et al. (2013). Glucose Levels and Risk of Dementia.
- Crini, G. (2014). Review: A History of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* 114, 10940–10975.
- Culioli, G. (2003). A lupane triterpene from frankincense (*Boswellia* sp., Burseraceae). *Phytochemistry* 62, 537–541.
- Cummings, J.L. (2004). Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 351, 56–67.
- Cummings, J.L., Morstorf, T., and Zhong, K. (2014). Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimers Res. Ther.* 6, 37.
- Das, S., Ng, W.K., Kanaujia, P., Kim, S., and Tan, R.B.H. (2011). Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: effects of process variables. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 88, 483–489.
- Das, S., Ng, W.K., and Tan, R.B.H. (2012). Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? *Eur. J. Pharm. Sci.* 47, 139–151.
- Dash, M., Patra, J.K., and Panda, P.P. (2008). Phytochemical and antimicrobial screening of extracts of *Aquilaria agallocha* Roxb. *Afr. J. Biotechnol.* 7.
- Daugherty, A.L., and Mrsny, R.J. (1999). Transcellular uptake mechanisms of the intestinal epithelial barrier Part one. *Pharm. Sci. Technol. Today* 2, 144–151.

- Derringer, G., and Suich, R. (1980). Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *J. Qual. Technol.* *12*, 214–219.
- Dhanalakshmi, C., Manivasagam, T., Nataraj, J., Justin Thenmozhi, A., and Essa, M.M. (2015). Neurosupportive Role of Vanillin, a Natural Phenolic Compound, on Rotenone Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM 2015*.
- Di Marco, L.Y., Marzo, A., Muñoz-Ruiz, M., Ikram, M.A., Kivipelto, M., Ruefenacht, D., Venneri, A., Soininen, H., Wanke, I., Ventikos, Y.A., et al. (2014). Modifiable lifestyle factors in dementia: a systematic review of longitudinal observational cohort studies. *J. Alzheimers Dis. JAD* *42*, 119–135.
- Dressman, J.B., Amidon, G.L., Reppas, C., and Shah, V.P. (1998). Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm. Res.* *15*, 11–22.
- Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., Dekosky, S.T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., et al. (2007). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol.* *6*, 734–746.
- Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., Cummings, J.L., Dekosky, S.T., Barberger-Gateau, P., Delacourte, A., Frisoni, G., Fox, N.C., Galasko, D., et al. (2010). Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol.* *9*, 1118–1127.
- Dugan, L.L., Sensi, S.L., Canzoniero, L.M., Handran, S.D., Rothman, S.M., Lin, T.S., Goldberg, M.P., and Choi, D.W. (1995). Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *15*, 6377–6388.
- Dwivedi, C., Valluri, H.B., Guan, X., and Agarwal, R. (2006). Chemopreventive effects of α -santalol on ultraviolet B radiation-induced skin tumor development in SKH-1 hairless mice. *Carcinogenesis* *27*, 1917–1922.
- Ekambaram, P., Sathali, A.A.H., and Priyanka, K. (2012). SOLID LIPID NANOPARTICLES: A REVIEW. *23*.
- Eldem, T., Speiser, P., and Hincal, A. (1991). Optimization of spray-dried and -congealed lipid micropellets and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy. *Pharm. Res.* *8*, 47–54.
- Erligmann, A. (2001). Sandalwood oils. *Int. J. Aromather.* *11*, 186–192.
- Esposito, E., Fantin, M., Marti, M., Drechsler, M., Paccamiccio, L., Mariani, P., Sivieri, E., Lain, F., Menegatti, E., Morari, M., et al. (2008). Solid Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for Bromocriptine. *Pharm. Res.* *25*, 1521–1530.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2008). Camphor in flavourings and other food ingredients with flavouring properties - Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission. *EFSA J.* *6*.

- Evans, D.A., Bennett, D.A., Wilson, R.S., Bienias, J.L., Morris, M.C., Scherr, P.A., Hebert, L.E., Aggarwal, N., Beckett, L.A., Joglekar, R., et al. (2003). Incidence of Alzheimer Disease in a Biracial Urban Community: Relation to Apolipoprotein E Allele Status. *Arch. Neurol.* *60*, 185–189.
- Fang, K., Li, R., and Sudjianto, A. (2006). *Design and modeling for computer experiments* (Boca Raton, FL: Chapman & Hall/CRC).
- Farbood, Y., Sarkaki, A., Hashemi, S., Mansouri, M.T., and Dianat, M. (2013). The effects of gallic acid on pain and memory following transient global ischemia/reperfusion in Wistar rats. *Avicenna J. Phytomedicine* *3*, 329–340.
- Farina, N., Rusted, J., and Tabet, N. (2014). The effect of exercise interventions on cognitive outcome in Alzheimer's disease: a systematic review. *Int. Psychogeriatr.* *26*, 9–18.
- Farrer, L.A., Cupples, L.A., Haines, J.L., Hyman, B., Kukull, W.A., Mayeux, R., Myers, R.H., Pericak-Vance, M.A., Risch, N., and Duijn, C.M. van (1997). Effects of Age, Sex, and Ethnicity on the Association Between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease: A Meta-analysis. *JAMA* *278*, 1349–1356.
- Feres, M., Figueiredo, L.C., Barreto, I.M., Coelho, M.H., Araujo, M.W., and Cortelli, S.C. (2005). In vitro antimicrobial activity of plant extracts and propolis in saliva samples of healthy and periodontally-involved subjects. *J. Int. Acad. Periodontol.* *7*, 90–96.
- Ferlin, F., Luciani, L., Santoro, S., Marrocchi, A., Lanari, D., Bechtoldt, A., Ackermann, L., and Vaccaro, L. (2018). A continuous flow approach for the C–H functionalization of 1,2,3-triazoles in γ -valerolactone as a biomass-derived medium. *Green Chem.* *20*, 2888–2893.
- Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., Loiseau, A.-M., Périchet, C., and Delbecq, C. (2003). Volatile constituents of benzoin gums: Siam and Sumatra. Part 1. *Flavour Fragr. J.* *18*, 328–333.
- Finch, C.E., and Morgan, T.E. (2007). Systemic inflammation, infection, ApoE alleles, and Alzheimer disease: a position paper. *Curr. Alzheimer Res.* *4*, 185–189.
- Finder, V.H., and Glockshuber, R. (2007). Amyloid-beta aggregation. *Neurodegener. Dis.* *4*, 13–27.
- Fitzpatrick, A.L., Kuller, L.H., Ives, D.G., Lopez, O.L., Jagust, W., Breitner, J.C.S., Jones, B., Lyketsos, C., and Dulberg, C. (2004). Incidence and Prevalence of Dementia in the Cardiovascular Health Study. *J. Am. Geriatr. Soc.* *52*, 195–204.
- Fratiglioni, L., Ahlbom, A., Viitanen, M., and Winblad, B. (1993). Risk factors for late-onset Alzheimer's disease: a population-based, case-control study. *Ann. Neurol.* *33*, 258–266.
- Fratiglioni, L., De Ronchi, D., and Agüero-Torres, H. (1999). Worldwide prevalence and incidence of dementia. *Drugs Aging* *15*, 365–375.
- Gao, S., Hendrie, H.C., Hall, K.S., and Hui, S. (1998). The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Arch. Gen. Psychiatry* *55*, 809–815.

Garayev, E., Herbette, G., Di Giorgio, C., Chiffolleau, P., Roux, D., Sallanon, H., Ollivier, E., Elias, R., and Baghdikian, B. (2017). New sesquiterpene acid and inositol derivatives from *Inula montana* L. *Fitoterapia* 120, 79–84.

Garrod, R. (1993). Desmosomes and hemidesmosomes. 30–40.

Gastaldi, L., Battaglia, L., Peira, E., Chirio, D., Muntoni, E., Solazzi, I., Gallarate, M., and Dosio, F. (2014). Solid lipid nanoparticles as vehicles of drugs to the brain: Current state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87, 433–444.

Glaser, T., Winter, S., Groscurth, P., Safayhi, H., Sailer, E.R., Ammon, H.P., Schabet, M., and Weller, M. (1999). Boswellic acids and malignant glioma: induction of apoptosis but no modulation of drug sensitivity., Boswellic acids and malignant glioma: induction of apoptosis but no modulation of drug sensitivity. *Br. J. Cancer* 80, 80, 756, 756–765.

Glenner, G.G., and Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885–890.

Goedert, M., Wischik, C.M., Crowther, R.A., Walker, J.E., and Klug, A. (1988). Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 4051–4055.

Gokhale, A.B., Damre, A.S., Kulkarni, K.R., and Saraf, M.N. (2002). Preliminary evaluation of anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *S. lappa*, *A. speciosa* and *A. aspera*. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* 9, 433–437.

Goldman, J.S., Hahn, S.E., Catania, J.W., Larusse-Eckert, S., Butson, M.B., Rumbaugh, M., Strecker, M.N., Roberts, J.S., Burke, W., Mayeux, R., et al. (2011). Genetic counseling and testing for Alzheimer disease: Joint practice guidelines of the American College of Medical Genetics and the National Society of Genetic Counselors. *Genet. Med.* 13, 597–605.

Göppert, T.M., and Müller, R.H. (2005). Polysorbate-stabilized solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: Comparison of plasma protein adsorption patterns. *J. Drug Target.* 13, 179–187.

Götz, J., and Ittner, L.M. (2008). Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 532–544.

Goupy, J. (1999). Plans d'expériences pour surfaces de réponse.

Goupy, J. (2001). Introduction aux plans d'expériences - PDF Free Download.

Green, R.C., Cupples, L.A., Go, R., Benke, K.S., Edeki, T., Griffith, P.A., Williams, M., Hips, Y., Graff-Radford, N., Bachman, D., et al. (2002). Risk of Dementia Among White and African American Relatives of Patients With Alzheimer Disease. *JAMA* 287, 329–336.

Grieve, M.M., and Leyel, M.C.F. (1973). *A modern herbal: the medicinal, culinary, cosmetic and economic properties, cultivation and folklore of herbs, grasses, fungi, shrubs and trees with all their modern scientific uses -- Revised edition* (London [England]; New York: Cresset Press Distributed by Dorset Press).

- Griffin, W.C. (1946). Classification of surface-active agents by. *J Soc Cosmet. Chem.* 1, 311–326.
- Groot, C., Hooghiemstra, A.M., Raijmakers, P.G.H.M., van Berckel, B.N.M., Scheltens, P., Scherder, E.J.A., van der Flier, W.M., and Ossenkoppele, R. (2016). The effect of physical activity on cognitive function in patients with dementia: A meta-analysis of randomized control trials. *Ageing Res. Rev.* 25, 13–23.
- Grossberg, G.T., Christensen, D.D., Griffith, P.A., Kerwin, D.R., Hunt, G., and Hall, E.J. (2010). The Art of Sharing the Diagnosis and Management of Alzheimer's Disease With Patients and Caregivers: Recommendations of an Expert Consensus Panel. *Prim. Care Companion J. Clin. Psychiatry* 12.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., and Wisniewski, H.M. (1986). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 261, 6084–6089.
- Grzywacz, J., Segel-Karpas, D., and Lachman, M. (2016). Workplace Exposures and Cognitive Function During Adulthood: Evidence From National Survey of Midlife Development and the O*NET. *J. Occup. Environ. Med.* 58, 535–541.
- Gudala, K., Bansal, D., Schifano, F., and Bhansali, A. (2013). Diabetes mellitus and risk of dementia: A meta-analysis of prospective observational studies. *J. Diabetes Investig.* 4, 640–650.
- Guiguet, M., Ghosn, J., Duvivier, C., Meynard, J.-L., Gras, G., Partisani, M., Teicher, E., Mahamat, A., Rodenbourg, F., Launay, O., et al. (2012). Boosted protease inhibitor monotherapy as a maintenance strategy: an observational study. *AIDS Lond. Engl.* 26, 2345–2350.
- Gülçin, İ., Güngör Şat, İ., Beydemir, Ş., Elmastaş, M., and İrfan Küfrevioğlu, Ö. (2004). Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chem.* 87, 393–400.
- Guo, J., Duan, J., Tang, Y., and Li, Y. (2011). Sedative and anticonvulsant activities of styrax after oral and intranasal administration in mice. *Pharm. Biol.* 49, 1034–1038.
- Gupta, S., Kesarla, R., and Omri, A. (2013). Formulation strategies to improve the bioavailability of poorly absorbed drugs with special emphasis on self-emulsifying systems. *ISRN Pharm.* 2013, 848043.
- Guttman, J.A., and Finlay, B.B. (2009). Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1788, 832–841.
- Güven, M., Aras, A.B., Akman, T., Sen, H.M., Ozkan, A., Salis, O., Sehitoglu, I., Kalkan, Y., Silan, C., Deniz, M., et al. (2015). Neuroprotective effect of p-coumaric acid in rat model of embolic cerebral ischemia. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 18, 356–363.
- Hajipour, S., Sarkaki, A., Farbood, Y., Eidi, A., Mortazavi, P., and Valizadeh, Z. (2016). Effect of Gallic Acid on Dementia Type of Alzheimer Disease in Rats: Electrophysiological and Histological Studies. *Basic Clin. Neurosci.* 7, 97–106.

- Harborne, J.B., Baxter, H., and Moss, G.P. (1999). *Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants* (London ; Philadelphia: Taylor & Francis).
- Hardman, R.J., Kennedy, G., Macpherson, H., Scholey, A.B., and Pipingas, A. (2016). Adherence to a Mediterranean-Style Diet and Effects on Cognition in Adults: A Qualitative Evaluation and Systematic Review of Longitudinal and Prospective Trials. *Front. Nutr.* 3, 22.
- Hardy, J. (2006). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis: an update and reappraisal. *J. Alzheimers Dis. JAD* 9, 151–153.
- Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356.
- Hardy, J., Duff, K., Hardy, K.G., Perez-Tur, J., and Hutton, M. (1998). Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat. Neurosci.* 1, 355–358.
- Harris, C.D., Watson, K.B., Carlson, S.A., Fulton, J.E., Dorn, J.M., and Elam-Evans, L. (2013). Adult Participation in Aerobic and Muscle-Strengthening Physical Activities — United States, 2011. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 62, 326–330.
- Hartsock, A., and Nelson, W.J. (2008). Adherens and Tight Junctions: Structure, Function and Connections to the Actin Cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 660–669.
- Hawkins, B.T., and Davis, T.P. (2005). The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacol. Rev.* 57, 173–185.
- Hebert, L.E., Bienias, J.L., Aggarwal, N.T., Wilson, R.S., Bennett, D.A., Shah, R.C., and Evans, D.A. (2010). Change in risk of Alzheimer disease over time. *Neurology* 75, 786–791.
- Hebert, L.E., Weuve, J., Scherr, P.A., and Evans, D.A. (2013). Alzheimer disease in the United States (2010–2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* 80, 1778–1783.
- Hemanth Kumar, K., Tamatam, A., Pal, A., and Khanum, F. (2013). Neuroprotective effects of *Cyperus rotundus* on SIN-1 induced nitric oxide generation and protein nitration: Ameliorative effect against apoptosis mediated neuronal cell damage. *NeuroToxicology* 34, 150–159.
- Hermann, A., Sitdikova, G.F., and Weiger, T.M. (2015). Oxidative Stress and Maxi Calcium-Activated Potassium (BK) Channels. *Biomolecules* 5, 1870–1911.
- Hetal, T., Bindesh, P., and Sneha, T. (2010). A REVIEW ON TECHNIQUES FOR ORAL BIOAVAILABILITY ENHANCEMENT OF DRUGS. 4, 21.
- Hong, S.-Y., Jeong, W.-S., and Jun, M. (2012). Protective effects of the key compounds isolated from *Corni fructus* against β -amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Mol. Basel Switz.* 17, 10831–10845.
- Howes, M.-J.R., and Houghton, P.J. (2003). Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75, 513–527.

- Hu, L., Tang, X., and Cui, F. (2004). Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 1527–1535.
- Huang, G., Zhang, N., Bi, X., and Dou, M. (2008). Solid lipid nanoparticles of temozolomide: Potential reduction of cardiac and nephric toxicity. *Int. J. Pharm.* 355, 314–320.
- Huda, A.W.N., Munira, M. a. S., Fitrya, S.D., and Salmah, M. (2009). Antioxidant activity of *Aquilaria malaccensis* (thymelaeaceae) leaves. *Pharmacogn. Res.* 1, 270.
- Huo, J., and Zhou, S. (2007). New research on development of solid lipid nanoparticles. *J. Med. Coll. PLA* 22, 385–390.
- Huss, U., Ringbom, T., Perera, P., Bohlin, L., and Vasänge, M. (2002). Screening of ubiquitous plant constituents for COX-2 inhibition with a scintillation proximity based assay. *J. Nat. Prod.* 65, 1517–1521.
- Hussein, G., Miyashiro, H., Nakamura, N., Hattori, M., Kakiuchi, N., and Shimotohno, K. (2000). Inhibitory effects of sudanese medicinal plant extracts on hepatitis C virus (HCV) protease. *Phytother. Res. PTR* 14, 510–516.
- Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., et al. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702–705.
- Ibrahim, A.H., Al-Rawi, S.S., Majid, A.M.S.A., Rahman, N.N.A., Salah, K.M.A., and Kadir, M.O.A. (2011). Separation and Fractionation of *Aquilaria Malaccensis* Oil Using Supercritical Fluid Extraction and tThe Cytotoxic Properties of the Extracted Oil. *Procedia Food Sci.* 1, 1953–1959.
- Institute of Medicine, and Aging, C. on the P.H.D. of C. (2015). *Cognitive Aging: Progress in Understanding and Opportunities for Action* (National Academies Press).
- Iskandar, S., Gnansounou, M.S., Robin, M., Lorquin, J., Gorgio, C.D., and Piccerelle, P. (2018). Antioxidant, Anti-inflammatory and Neuroprotective Activities of a Plant Extract Derived from Traditional Chinese Medicine: SuHeXiang Wan (AT000). *Chem. Adv. Mater.* 3, 36–59.
- Jack, C.R., Lowe, V.J., Weigand, S.D., Wiste, H.J., Senjem, M.L., Knopman, D.S., Shiung, M.M., Gunter, J.L., Boeve, B.F., Kemp, B.J., et al. (2009). Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease. *Brain* 132, 1355–1365.
- Jack, C.R., Albert, M.S., Knopman, D.S., McKhann, G.M., Sperling, R.A., Carrillo, M.C., Thies, B., and Phelps, C.H. (2011). Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 7, 257–262.
- Jagtap, A.G., Shirke, S.S., and Phadke, A.S. (2004). Effect of polyherbal formulation on experimental models of inflammatory bowel diseases. *J. Ethnopharmacol.* 90, 195–204.
- Jalbert, J.J., Daiello, L.A., and Lapane, K.L. (2008). Dementia of the Alzheimer type. *Epidemiol. Rev.* 30, 15–34.

- Jan, A., Hartley, D.M., and Lashuel, H.A. (2010). Preparation and characterization of toxic A β aggregates for structural and functional studies in Alzheimer's disease research. *Nat. Protoc.* 5, 1186–1209.
- Jenssen, H., Hamill, P., and Hancock, R.E. (2006). Peptide antimicrobial agents., Peptide Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev. Clin. Microbiol. Rev.* 19, 491, 491–511.
- Jeon, S., Hur, J., Jeong, H.J., Koo, B.-S., and Pak, S.C. (2011). SuHeXiang Wan essential oil alleviates amyloid beta induced memory impairment through inhibition of tau protein phosphorylation in mice. *Am. J. Chin. Med.* 39, 917–932.
- Jicha, G.A., and Carr, S.A. (2010). Conceptual evolution in Alzheimer's disease: implications for understanding the clinical phenotype of progressive neurodegenerative disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 19, 253–272.
- Jin, M., Lee, H.J., Ryu, J.H., and Chung, K.S. (2000). Inhibition of LPS-induced NO production and NF-kappaB activation by a sesquiterpene from *Saussurea lappa*. *Arch. Pharm. Res.* 23, 54–58.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., and Schmidt, E. (2006). Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6303–6307.
- Jorm, A.F., and Jolley, D. (1998). The incidence of dementia: a meta-analysis. *Neurology* 51, 728–733.
- Jung, H.A., Yokozawa, T., Kim, B.-W., Jung, J.H., and Choi, J.S. (2010). Selective inhibition of prenylated flavonoids from *Sophora flavescens* against BACE1 and cholinesterases. *Am. J. Chin. Med.* 38, 415–429.
- Jung, S.-H., Kim, S.J., Jun, B.-G., Lee, K.-T., Hong, S.-P., Oh, M.S., Jang, D.S., and Choi, J.-H. (2013). α -Cyperone, isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus*, inhibits LPS-induced COX-2 expression and PGE2 production through the negative regulation of NF κ B signalling in RAW 264.7 cells. *J. Ethnopharmacol.* 147, 208–214.
- Kamkar Asl, M., Nazariborun, A., and Hosseini, M. (2013). Analgesic effect of the aqueous and ethanolic extracts of clove. *Avicenna J. Phytomedicine* 3, 186–192.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., and Jessell, T.M. (2000). Principles of neural science (New York: McGraw-Hill, Health Professions Division).
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733–736.
- Kantarci, K., Weigand, S.D., Przybelski, S.A., Shiung, M.M., Whitwell, J.L., Negash, S., Knopman, D.S., Boeve, B.F., O'Brien, P.C., Petersen, R.C., et al. (2009). Risk of dementia in MCI: Combined effect of cerebrovascular disease, volumetric MRI, and 1H MRS. *Neurology* 72, 1519–1525.

- Karkan, D., Pfeifer, C., Vitalis, T.Z., Arthur, G., Ujiie, M., Chen, Q., Tsai, S., Koliatis, G., Gabathuler, R., and Jefferies, W.A. (2008). A Unique Carrier for Delivery of Therapeutic Compounds beyond the Blood-Brain Barrier. *PLOS ONE* 3, e2469.
- Karp, A., Paillard-Borg, S., Wang, H.-X., Silverstein, M., Winblad, B., and Fratiglioni, L. (2006). Mental, Physical and Social Components in Leisure Activities Equally Contribute to Decrease Dementia Risk. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 21, 65–73.
- Katzman, R. (1986). Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 314, 964–973.
- Kaur, M., Agarwal, C., Singh, R.P., Guan, X., Dwivedi, C., and Agarwal, R. (2005). Skin cancer chemopreventive agent, α -santalol, induces apoptotic death of human epidermoid carcinoma A431 cells via caspase activation together with dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome c release. *Carcinogenesis* 26, 369–380.
- Kawas, C., Gray, S., Brookmeyer, R., Fozard, J., and Zonderman, A. (2000). Age-specific incidence rates of Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurology* 54, 2072–2077.
- Kilani, S., Abdelwahed, A., Ben Ammar, R., Hayder, N., Ghedira, K., Cheraief, I., Hammami, M., and Chekir-Ghedira, L. (2005a). Chemical Composition, Antibacterial and Antimutagenic Activities of Essential Oil from (Tunisian) *Cyperus rotundus*. *J. Essent. Oil Res. - J ESSENT OIL RES* 17, 695–700.
- Kilani, S., Ben Ammar, R., Bouhlel, I., Abdelwahed, A., Hayder, N., Mahmoud, A., Ghedira, K., and Chekir-Ghedira, L. (2005b). Investigation of extracts from (Tunisian) *Cyperus rotundus* as antimutagens and radical scavengers. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20, 478–484.
- Kilani, S., Ledauphin, J., Bouhlel, I., Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Skandrani, I., Mosrati, R., Ghedira, K., Barillier, D., and Chekir-Ghedira, L. (2008a). Comparative study of *Cyperus rotundus* essential oil by a modified GC/MS analysis method. Evaluation of its antioxidant, cytotoxic, and apoptotic effects. *Chem. Biodivers.* 5, 729–742.
- Kilani, S., Ben Sghaier, M., Limem, I., Bouhlel, I., Boubaker, J., Bhourri, W., Skandrani, I., Neffatti, A., Ben Ammar, R., Dijoux-Franca, M.G., et al. (2008b). In vitro evaluation of antibacterial, antioxidant, cytotoxic and apoptotic activities of the tubers infusion and extracts of *Cyperus rotundus*. *Bioresour. Technol.* 99, 9004–9008.
- Kim, Y.H., and Park, J.H. (2017). Vanillin and 4-hydroxybenzyl alcohol attenuate cognitive impairment and the reduction of cell proliferation and neuroblast differentiation in the dentate gyrus in a mouse model of scopolamine-induced amnesia. *Anat. Cell Biol.* 50, 143–151.
- Kim, E.J., Hong, J.E., Lim, S.S., Kwon, G.T., Kim, J., Kim, J.-S., Lee, K.W., and Park, J.H.Y. (2012). The hexane extract of *Saussurea lappa* and its active principle, dehydrocostus lactone, inhibit prostate cancer cell migration. *J. Med. Food* 15, 24–32.
- Kim, S.S., Oh, O.-J., Min, H.-Y., Park, E.-J., Kim, Y., Park, H.J., Nam Han, Y., and Lee, S.K. (2003). Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. *Life Sci.* 73, 337–348.

- Kim, T.H., Ito, H., Hayashi, K., Hasegawa, T., Machiguchi, T., and Yoshida, T. (2005a). Aromatic Constituents from the Heartwood of *Santalum album* L. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 53, 641–644.
- Kim, T.H., Ito, H., Hatano, T., Hasegawa, T., Akiba, A., Machiguchi, T., and Yoshida, T. (2005b). Bisabolane- and Santalane-Type Sesquiterpenoids from *Santalum album* of Indian Origin. *J. Nat. Prod.* 68, 1805–1808.
- Kim, T.H., Ito, H., Hatano, T., Takayasu, J., Tokuda, H., Nishino, H., Machiguchi, T., and Yoshida, T. (2006). New antitumor sesquiterpenoids from *Santalum album* of Indian origin. *Tetrahedron* 62, 6981–6989.
- Kim, Y.C., Lee, E.H., Lee, Y.M., Kim, H.K., Song, B.K., Lee, E.J., and Kim, H.M. (1997). Effect of the aqueous extract of *Aquilaria agallocha* stems on the immediate hypersensitivity reactions. *J. Ethnopharmacol.* 58, 31–38.
- Koch, C., Reichling, J., Schneele, J., and Schnitzler, P. (2008). Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. *Phytomedicine* 15, 71–78.
- Koo, B.-S., Lee, S.-I., Ha, J.-H., and Lee, D.-U. (2004). Inhibitory effects of the essential oil from SuHeXiang Wan on the central nervous system after inhalation. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 515–519.
- Korani, M.S., Farbood, Y., Sarkaki, A., Fathi Moghaddam, H., and Taghi Mansouri, M. (2014). Protective effects of gallic acid against chronic cerebral hypoperfusion-induced cognitive deficit and brain oxidative damage in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 733, 62–67.
- Košćak Tivadar, B. (2017). Physical activity improves cognition: possible explanations. *Biogerontology* 18, 477–483.
- Krabbe, K.S., Pedersen, M., and Bruunsgaard, H. (2004). Inflammatory mediators in the elderly. *Exp. Gerontol.* 39, 687–699.
- Kreuter, J., and Gelperina, S. (2008). Use of nanoparticles for cerebral cancer. *Tumori* 94, 271–277.
- Kukull, W.A., Higdon, R., Bowen, J.D., McCormick, W.C., Teri, L., Schellenberg, G.D., Belle, G. van, Jolley, L., and Larson, E.B. (2002). Dementia and Alzheimer Disease Incidence: A Prospective Cohort Study. *Arch. Neurol.* 59, 1737–1746.
- Kumari, A., Yadav, S.K., and Yadav, S.C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 75, 1–18.
- Kurokawa, M., Nagasaka, K., Hirabayashi, T., Uyama, S., Sato, H., Kageyama, T., Kadota, S., Ohyama, H., Hozumi, T., and Namba, T. (1995). Efficacy of traditional herbal medicines in combination with acyclovir against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 27, 19–37.
- Kurokawa, M., Hozumi, T., Basnet, P., Nakano, M., Kadota, S., Namba, T., Kawana, T., and Shiraki, K. (1998). Purification and Characterization of Eugeniiin as an Anti-herpesvirus Compound from *Geum japonicum* and *Syzygium aromaticum*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284, 728–735.

- Lahmy, V., Long, R., Morin, D., Villard, V., and Maurice, T. (2015). Mitochondrial protection by the mixed muscarinic/ σ 1 ligand ANAVEX2-73, a tetrahydrofuran derivative, in A β 25–35 peptide-injected mice, a nontransgenic Alzheimer's disease model. *Front. Cell. Neurosci.* 8.
- Lampe, P.D., and Lau, A.F. (2004). The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1171–1186.
- Lan, J.-S., Hou, J.-W., Liu, Y., Ding, Y., Zhang, Y., Li, L., and Zhang, T. (2017). Design, synthesis and evaluation of novel cinnamic acid derivatives bearing N-benzyl pyridinium moiety as multifunctional cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 32, 776–788.
- larbi, M. amin M. side (2015). Développement d'un système thérapeutique innovant, administré par voie orale, dans le traitement de la progeria et d'autres pathologies génétiques ou acquises avec accumulation d'une lamine a isoprenylée.
- Larhed, A.W., Artursson, P., and Björk, E. (1998). The influence of intestinal mucus components on the diffusion of drugs. *Pharm. Res.* 15, 66–71.
- Larhsini, M., Oumoulid, L., Lazrek, H.B., Wataleb, S., Bousaid, M., Bekkouche, K., and Jana, M. (2001). Antibacterial activity of some Moroccan medicinal plants. *Phytother. Res. PTR* 15, 250–252.
- Lasa-Saracibar, B., Mendoza, A.E.-H. de, Guada, M., Dios-Vieitez, C., and Blanco-Prieto, M.J. (2012). Lipid nanoparticles for cancer therapy: state of the art and future prospects. *Expert Opin. Drug Deliv.* 9, 1245–1261.
- Latha, R.C.R., and Daisy, P. (2011). Insulin-secretagogue, antihyperlipidemic and other protective effects of gallic acid isolated from *Terminalia bellerica* Roxb. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chem. Biol. Interact.* 189, 112–118.
- Lautenschlager, N.T., Cupples, L.A., Rao, V.S., Auerbach, S.A., Becker, R., Burke, J., Chui, H., Duara, R., Foley, E.J., Glatt, S.L., et al. (1996). Risk of dementia among relatives of Alzheimer's disease patients in the MIRAGE study: What is in store for the oldest old? *Neurology* 46, 641–650.
- Lecrux, C., and Hamel, E. (2011). The neurovascular unit in brain function and disease. *Acta Physiol.* 203, 47–59.
- Lee, S. (2000). Mating system parameters of *Dryobalanops aromatica* Gaertn. f. (Dipterocarpaceae) in three different forest types and a seed orchard. *Heredity* 85, 338–345.
- Lee, G.I., Ha, J.Y., Min, K.R., Nakagawa, H., Tsurufuji, S., Chang, I.M., and Kim, Y. (1995). Inhibitory effects of Oriental herbal medicines on IL-8 induction in lipopolysaccharide-activated rat macrophages. *Planta Med.* 61, 26–30.
- Lewis, J., Dickson, D.W., Lin, W.L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S.H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., et al. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293, 1487–1491.

- Lin, S.Y., and Kawashima, Y. (1985). The influence of three poly(oxyethylene)poly(oxypropylene) surface-active block copolymers on the solubility behavior of indomethacin. *Pharm. Acta Helv.* 60, 339–344.
- Lingbeck, J.M., O'Bryan, C.A., Martin, E.M., Adams, J.P., and Crandall, P.G. (2015). Sweetgum: An ancient source of beneficial compounds with modern benefits. *Pharmacogn. Rev.* 9, 1.
- Lippacher, A., Müller, R.H., and Mäder, K. (2000). Investigation on the viscoelastic properties of lipid based colloidal drug carriers. *Int. J. Pharm.* 196, 227–230.
- Lott, I.T., and Dierssen, M. (2010). Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with Down's syndrome. *Lancet Neurol.* 9, 623–633.
- Lourida, I., Soni, M., Thompson-Coon, J., Purandare, N., Lang, I., Ukoumunne, O., and Llewellyn, D. (2013). Mediterranean Diet, Cognitive Function, and Dementia: A Systematic Review. *Epidemiology* 24, 479–489.
- Loy, C.T., Schofield, P.R., Turner, A.M., and Kwok, J.B. (2014). Genetics of dementia. *The Lancet* 383, 828–840.
- Lu, Y., Kang, W., Jiang, J., Chen, J., Xu, D., Zhang, P., Zhang, L., Feng, H., and Wu, H. (2017). Study on the stabilization mechanism of crude oil emulsion with an amphiphilic polymer using the β -cyclodextrin inclusion method. *RSC Adv.* 7, 8156–8166.
- Lyketsos, C.G., Colenda, C.C., Beck, C., Blank, K., Doraiswamy, M.P., Kalunian, D.A., Yaffe, K., and Task Force of American Association for Geriatric Psychiatry (2006). Position statement of the American Association for Geriatric Psychiatry regarding principles of care for patients with dementia resulting from Alzheimer disease. *Am. J. Geriatr. Psychiatry Off. J. Am. Assoc. Geriatr. Psychiatry* 14, 561–572.
- Madan, J., Pandey, R.S., Jain, V., Katare, O.P., Chandra, R., and Katyal, A. (2013). Poly (ethylene)-glycol conjugated solid lipid nanoparticles of noscipine improve biological half-life, brain delivery and efficacy in glioblastoma cells. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 9, 492–503.
- Mahley, R.W., and Rall, S.C. (2000). Apolipoprotein E: Far More Than a Lipid Transport Protein. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 1, 507–537.
- Manjunath, K., and Venkateswarlu, V. (2005). Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration. *J. Controlled Release* 107, 215–228.
- Mansouri, M.T., Naghizadeh, B., Ghorbanzadeh, B., Farbood, Y., Sarkaki, A., and Bavarsad, K. (2013). Gallic acid prevents memory deficits and oxidative stress induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 111, 90–96.
- Mansouri, M.T., Soltani, M., Naghizadeh, B., Farbood, Y., Mashak, A., and Sarkaki, A. (2014). A possible mechanism for the anxiolytic-like effect of gallic acid in the rat elevated plus maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 117, 40–46.

- Mark, R.J., Pang, Z., Geddes, J.W., Uchida, K., and Mattson, M.P. (1997). Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 1046–1054.
- Marnett, L.J., and Kalgutkar, A.S. (1999). Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 465–469.
- Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L., and Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 4245–4249.
- Mathers, C., Fat, D.M., and Boerma, J.T. (2008). World Health Organization (2002) The global burden of disease project. (Geneva, Switzerland: World Health Organization).
- Matsuo, Y., and Mimaki, Y. (2010). Lignans from *Santalum album* and Their Cytotoxic Activities. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 58, 587–590.
- Matsuo, Y., and Mimaki, Y. (2012). α -Santalol derivatives from *Santalum album* and their cytotoxic activities. *Phytochemistry* 77, 304–311.
- Mayeux, R., Sano, M., Chen, J., Tatemichi, T., and Stern, Y. (1991). Risk of Dementia in First-Degree Relatives of Patients With Alzheimer's Disease and Related Disorders. *Arch. Neurol.* 48, 269–273.
- Mayeux, R., Saunders, A.M., Shea, S., Mirra, S., Evans, D., Roses, A.D., Hyman, B.T., Crain, B., Tang, M.-X., and Phelps, C.H. (1998). Utility of the Apolipoprotein E Genotype in the Diagnosis of Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 338, 506–511.
- Mazza, M., Uchegbu, I.F., and Schätzlein, A.G. (2008). Cancer and the blood–brain barrier: 'Trojan horses' for courses? *Br. J. Pharmacol.* 155, 149–151.
- McCrone, P., Prina, M., Comas-Herrera, A., Wittenberg, R., Adelaja, B., Hu, B., King, D., Rehill, A., Salinkumar, D., Prince, M., et al. (2014). Dementia UK.
- McDaid, D.G., Kim, E.-M., Reid, R.E., Leslie, J.C., Cleary, J., and O'Hare, E. (2005). Parenteral antioxidant treatment preserves temporal discrimination following intrahippocampal aggregated A β (1-42) injections. *Behav. Pharmacol.* 16, 237–242.
- McDowell, I., Xi, G., Lindsay, J., and Tierney, M. (2007). Mapping the connections between education and dementia. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 29, 127–141.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., and Stadlan, E.M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34, 939–944.
- McKhann, G.M., Knopman, D.S., Chertkow, H., Hyman, B.T., Jack, C.R., Kawas, C.H., Klunk, W.E., Koroshetz, W.J., Manly, J.J., Mayeux, R., et al. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 7, 263–269.

- Mehnert, W., and Mäder, K. (2001). Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *47*, 165–196.
- Mehnert, W., and Mäder, K. (2012). Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *64*, 83–101.
- Meng, F., Asghar, S., Xu, Y., Wang, J., Jin, X., Wang, Z., Wang, J., Ping, Q., Zhou, J., and Xiao, Y. (2016). Design and evaluation of lipoprotein resembling curcumin-encapsulated protein-free nanostructured lipid carrier for brain targeting. *Int. J. Pharm.* *506*, 46–56.
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G.A., and Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* *36*, 587–597.
- Mestecky, J., and McGhee, J.R. (1987). Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv. Immunol.* *40*, 153–245.
- Miniyar, P.B., Chitre, T.S., Deuskar, H.J., Karve, S.S., and Jain, K.S. (2008). Antioxidant activity of ethyl acetate extract of *Aquilaria agallocha* on nitrite-induced methaemoglobin formation P. *Int. J. Green Pharm. IJGP* *2*.
- Mishra, A., Gauri, S.S., Mukhopadhyay, S.K., Chatterjee, S., Das, S.S., Mandal, S.M., and Dey, S. (2014). Identification and structural characterization of a new pro-apoptotic cyclic octapeptide cyclosaplin from somatic seedlings of *Santalum album* L. *Peptides* *54*, 148–158.
- Misik, J., Korabecny, J., Nepovimova, E., Cabelova, P., and Kassa, J. (2015). The effects of novel 7-MEOTA-donepezil like hybrids and N-alkylated tacrine analogues in the treatment of quinuclidinyl benzilate-induced behavioural deficits in rats performing the multiple T-maze test. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czechoslov.* *159*, 547–553.
- Misra, B. b., and Dey, S. (2012). Comparative phytochemical analysis and antibacterial efficacy of in vitro and in vivo extracts from East Indian sandalwood tree (*Santalum album*L.). *Lett. Appl. Microbiol.* *55*, 476–486.
- Misra, B.B., and Dey, S. (2013). TLC-bioautographic evaluation of in vitro anti-tyrosinase and anti-cholinesterase potentials of sandalwood oil. *Nat. Prod. Commun.* *8*, 253–256.
- Mitchell, A.J., and Shiri-Feshki, M. (2009). Rate of progression of mild cognitive impairment to dementia – meta-analysis of 41 robust inception cohort studies. *Acta Psychiatr. Scand.* *119*, 252–265.
- Miyazawa, M., and Hisama, M. (2001). Suppression of chemical mutagen-induced SOS response by alkylphenols from clove (*Syzygium aromaticum*) in the *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 umu test. *J. Agric. Food Chem.* *49*, 4019–4025.
- Morris, M.C., Tangney, C.C., Wang, Y., Sacks, F.M., Bennett, D.A., and Aggarwal, N.T. (2015a). MIND diet associated with reduced incidence of Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement.* *11*, 1007–1014.
- Morris, M.C., Tangney, C.C., Wang, Y., Sacks, F.M., Barnes, L.L., Bennett, D.A., and Aggarwal, N.T. (2015b). MIND diet slows cognitive decline with aging. *Alzheimers Dement.* *11*, 1015–1022.

- Mullard, A. (2017). BACE inhibitor bust in Alzheimer trial. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 155.
- Muller, R.H., and Keck, C.M. (2004). Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs--a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *J. Biotechnol.* 113, 151–170.
- Müller, R.H., Mäder, K., and Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 161–177.
- Myers, R.H., Montgomery, D., Vining, G.G., Borrer, C.M., and Kowalski, S.M. (2004). Response Surface Methodology: A Retrospective and Literature Survey. *J. Qual. Technol.* 36, 53–78.
- Naghizadeh, B., and Mansouri, M.T. (2015). Protective Effects of Gallic Acid against Streptozotocin-induced Oxidative Damage in Rat Striatum. *Drug Res.* 65, 515–520.
- National Down Syndrome Society (2017). National Down Syndrome Society. An Introduction to Alzheimer's. Available at: <http://www.ndss.org/Resources/Aging-Matters/Alzheimers-Disease/An-Introduction-to-Alzheimers-Disease/>.
- National Institutes of Health, National Institute on Aging (2017). What Happens to the Brain in Alzheimer's Disease?
- Neuwelt, E.A. (1989). Implications of the Blood-Brain Barrier and Its Manipulation Volume 1 Basic Science Aspects.
- Neuwelt, E., Abbott, N.J., Abrey, L., Banks, W.A., Blakley, B., Davis, T., Engelhardt, B., Grammas, P., Nedergaard, M., Nutt, J., et al. (2008). Strategies to advance translational research into brain barriers. *Lancet Neurol.* 7, 84–96.
- Ngandu, T., Lehtisalo, J., Solomon, A., Levälähti, E., Ahtiluoto, S., Antikainen, R., Bäckman, L., Hänninen, T., Jula, A., Laatikainen, T., et al. (2015). A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): a randomised controlled trial. *The Lancet* 385, 2255–2263.
- Niho, N., Shibutani, M., Tamura, T., Toyoda, K., Uneyama, C., Takahashi, N., and Hirose, M. (2001). Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 39, 1063–1070.
- Ochi, T., Shibata, H., Higuti, T., Kodama, K., Kusumi, T., and Takaishi, Y. (2005). Anti-Helicobacter pylori Compounds from Santalum album. *J. Nat. Prod.* 68, 819–824.
- Ogata, M., Hoshi, M., Urano, S., and Endo, T. (2000). Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 48, 1467–1469.
- Ohara, T., Ninomiya, T., Hata, J., Ozawa, M., Yoshida, D., Mukai, N., Nagata, M., Iwaki, T., Kitazono, T., Kanba, S., et al. (2015). Midlife and Late-Life Smoking and Risk of Dementia in the Community: The Hisayama Study. *J. Am. Geriatr. Soc.* 63, 2332–2339.

- Ohmori, A., Shinomiya, K., Utsu, Y., Tokunaga, S., Hasegawa, Y., and Kamei, C. (2007). [Effect of santalol on the sleep-wake cycle in sleep-disturbed rats]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 27, 167–171.
- Oldfield, S. (1998). *The World List of Threatened Trees* (WCMC, IUCN).
- Omwoyo, W.N., Ogutu, B., Oloo, F., Swai, H., Kalombo, L., Melariri, P., Mahanga, G.M., and Gathirwa, J.W. (2014). Preparation, characterization, and optimization of primaquine-loaded solid lipid nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 9, 3865–3874.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., and Prior, R.L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4619–4626.
- Oyagbemi, A.A., Omobowale, T.O., Saba, A.B., Olowu, E.R., Dada, R.O., and Akinrinde, A.S. (2016). Gallic Acid Ameliorates Cyclophosphamide-Induced Neurotoxicity in Wistar Rats Through Free Radical Scavenging Activity and Improvement in Antioxidant Defense System. *J. Diet. Suppl.* 13, 402–419.
- Pandey, A. (2014). Role of Surfactants as Penetration Enhancer in Transdermal Drug Delivery System. *J. Mol. Pharm. Org. Process Res.* 02.
- Pandey, M.M., Rastogi, S., and Rawat, A.K.S. (2007). *Saussurea costus*: botanical, chemical and pharmacological review of an ayurvedic medicinal plant. *J. Ethnopharmacol.* 110, 379–390.
- Pardridge, W.M. (2002). Why is the global CNS pharmaceutical market so under-penetrated? *Drug Discov. Today* 7, 5–7.
- Pardridge, W.M. (2003). BLOOD-BRAIN BARRIER DRUG TARGETING: THE FUTURE OF BRAIN DRUG DEVELOPMENT. *Mol. Interv.* 3, 90.
- Pardridge, W., de Boer, A.G., and Gaillard, P.J. (2002). Brain Drug Targeting: The Future of Brain Drug Development. *J. Clin. Pathol.* 55, 158.
- Park, I.-K. (2014). Fumigant toxicity of Oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*) and valerian (*Valeriana wallichii*) essential oils and their components, including their acetylcholinesterase inhibitory activity, against Japanese termites (*Reticulitermes speratus*). *Mol. Basel Switz.* 19, 12547–12558.
- Parveen, S., and Sahoo, S.K. (2006). Nanomedicine: clinical applications of polyethylene glycol conjugated proteins and drugs. *Clin. Pharmacokinet.* 45, 965–988.
- Patel, J.K., Patel, N.V., and Shah, S.H. (2009). In vitro controlled release of colon targeted mesalamine from compritol ATO 888 based matrix tablets using factorial design. *Res. Pharm. Sci.* 4, 63–75.
- Patel, M., Souto, E.B., and Singh, K.K. (2013). Advances in brain drug targeting and delivery: limitations and challenges of solid lipid nanoparticles. *Expert Opin. Drug Deliv.* 10, 889–905.
- Perry, G. (2006). *Alzheimer's disease: a century of scientific and clinical research* (Amsterdam ; Washington, DC: IOS Press).

- Persidsky, Y., Ramirez, S.H., Haorah, J., and Kanmogne, G.D. (2006). Blood–brain Barrier: Structural Components and Function Under Physiologic and Pathologic Conditions. *J. Neuroimmune Pharmacol.* *1*, 223–236.
- Phaneuf, M. (2007). *La maladie d’Alzheimer et la prise en charge infirmière* (Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson).
- Pharmanager (2016). Phinn, regulatory database for scientific innovation.
- Pond, S.M., and Tozer, T.N. (1984). First-Pass Elimination: Basic Concepts and Clinical Consequences. *Clin. Pharmacokinet.* *9*, 1–25.
- Pool, L.R., Weuve, J., Wilson, R.S., Bültmann, U., Evans, D.A., and Mendes de Leon, C.F. (2016). Occupational cognitive requirements and late-life cognitive aging. *Neurology* *86*, 1386–1392.
- Poorkaj, P., Bird, T.D., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R.M., Anderson, L., Andreadis, A., Wiederholt, W.C., Raskind, M., and Schellenberg, G.D. (1998). Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann. Neurol.* *43*, 815–825.
- Pourgholami, M.H., Kamalinejad, M., Javadi, M., Majzoob, S., and Sayyah, M. (1999). Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in male mice. *J. Ethnopharmacol.* *64*, 167–171.
- Prior, R.L., Wu, X., and Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* *53*, 4290–4302.
- Querfurth, H.W., and LaFerla, F.M. (2010). Alzheimer’s disease. *N. Engl. J. Med.* *362*, 329–344.
- Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Quintanar, A., Allémann, E., Fessi, H., and Doelker, E. (1998). Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion technique. *J. Microencapsul.* *15*, 107–119.
- Rabiei, Z., Hojjati, M., Rafieian-Kopaeia, M., and Alibabaei, Z. (2013). Effect of *Cyperus rotundus* tubers ethanolic extract on learning and memory in animal model of Alzheimer. *Biomed. Aging Pathol.* *3*, 185–191.
- Rahman, H., Vakati, K., and Eswaraiah, M.C. (2012). In-Vivo and In-Vitro Anti-Inflammatory Activity of *Aquilaria agallocha* Oil. *Int. J. Basic Med. Sci. Pharm. IJBMS* *2*.
- Rajakumar, D.V., and Rao, M.N. (1993). Dehydrozingerone and isoeugenol as inhibitors of lipid peroxidation and as free radical scavengers. *Biochem. Pharmacol.* *46*, 2067–2072.
- Ralay-Ranaivo, B. (2012). Développement d’une forme orale du fondaparinux. 266.
- Rapoport, M., Dawson, H.N., Binder, L.I., Vitek, M.P., and Ferreira, A. (2002). Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 6364–6369.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* *26*, 1231–1237.
- Reddy, R.K., Khalil, S.A., and Gouda, M.W. (1976). Dissolution Characteristics and Oral Absorption of Digitoxin and Digoxin Coprecipitates. *J. Pharm. Sci.* *65*, 1753–1758.
- Reiman, E.M., Quiroz, Y.T., Fleisher, A.S., Chen, K., Velez-Pardo, C., Jimenez-Del-Rio, M., Fagan, A.M., Shah, A.R., Alvarez, S., Arbelaez, A., et al. (2012). Brain imaging and fluid biomarker analysis in young adults at genetic risk for autosomal dominant Alzheimer's disease in the presenilin 1 E280A kindred: a case-control study. *Lancet Neurol.* *11*, 1048–1056.
- Reitz, C., Brayne, C., and Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* *7*, 137–152.
- Roberts, R., and Knopman, D.S. (2013). Classification and Epidemiology of MCI. *Clin. Geriatr. Med.* *29*, 753–772.
- Robinson, A., Kumar, T.V., Sreedhar, E., Naidu, V.G.M., Krishna, S.R., Babu, K.S., Srinivas, P.V., and Rao, J.M. (2008). A new sesquiterpene lactone from the roots of *Saussurea lappa*: structure-anticancer activity study. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *18*, 4015–4017.
- Roginsky, V., and Lissi, E.A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* *92*, 235–254.
- Rönnemaa, E., Zethelius, B., Lannfelt, L., and Kilander, L. (2011). Vascular Risk Factors and Dementia: 40-Year Follow-Up of a Population-Based Cohort. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* *31*, 460–466.
- Rubio-Perez, J.M., and Morillas-Ruiz, J.M. (2012). A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines. *Sci. World J.* *2012*.
- Rusanen, M., Kivipelto, M., Quesenberry, C.P., Zhou, J., and Whitmer, R.A. (2011). Heavy smoking in midlife and long-term risk of Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch. Intern. Med.* *171*, 333–339.
- Saczynski, J.S., Pfeifer, L.A., Masaki, K., Korf, E.S.C., Laurin, D., White, L., and Launer, L.J. (2006). The Effect of Social Engagement on Incident Dementia The Honolulu-Asia Aging Study. *Am. J. Epidemiol.* *163*, 433–440.
- Safayhi, H., and Sailer, E.-R. (1997). Anti-Inflammatory Actions of Pentacyclic Triterpenes. *Planta Med.* *63*, 487–493.
- Safayhi, H., Mack, T., Sabieraj, J., Anazodo, M.I., Subramanian, L.R., and Ammon, H.P. (1992). Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *261*, 1143–1146.
- Safayhi, H., Rall, B., Sailer, E.-R., and Ammon, H.P.T. (1997). Inhibition by Boswellic Acids of Human Leukocyte Elastase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *281*, 460–463.

- Sahoo, N., Manchikanti, P., and Dey, S. (2010). Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia* 81, 462–471.
- Saibabu, V., Fatima, Z., Khan, L.A., and Hameed, S. (2015). Therapeutic Potential of Dietary Phenolic Acids. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2015, 823539.
- Sakono, M., and Zako, T. (2010). Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. *FEBS J.* 277, 1348–1358.
- Salager, J.-L., ANTÓN, R., ANDÉREZ, J.M., and AUBRY, J.-M. (2001). Formulation des microémulsions par la méthode du HLD.
- Saleem, T.S., Lokanath, N., Prasanthi, A., Madhavi, M., Mallika, G., and Vishnu, M.N. (2013). Aqueous extract of *Saussurea lappa* root ameliorate oxidative myocardial injury induced by isoproterenol in rats., Aqueous extract of *Saussurea lappa* root ameliorate oxidative myocardial injury induced by isoproterenol in rats. *J. Adv. Pharm. Technol. Res. J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 4, 4, 94, 94–100.
- Santa-Maria, I., Haggiagi, A., Liu, X., Wasserscheid, J., Nelson, P.T., Dewar, K., Clark, L.N., and Crary, J.F. (2012). The MAPT H1 haplotype is associated with tangle-predominant dementia. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 124, 693–704.
- Santiago, J., Claeys-Bruno, M., and Sergent, M. (2012). Construction of space-filling designs using WSP algorithm for high dimensional spaces. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 113, 26–31.
- Santner, T.J., Williams, B.J., and Notz, W.I. (2003). *The Design and Analysis of Computer Experiments* (New York, NY: Springer New York).
- Saraç, N., and Şen, B. (2014). Antioxidant, mutagenic, antimutagenic activities, and phenolic compounds of *Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis*. *Ind. Crops Prod.* 53, 60–64.
- Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D., George-Hyslop, P.H., Pericak-Vance, M.A., Joo, S.H., Rosi, B.L., Gusella, J.F., Crapper-MacLachlan, D.R., and Alberts, M.J. (1993). Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 1467–1472.
- Scuderi, C., Stecca, C., Bronzuoli, M.R., Rotili, D., Valente, S., Mai, A., and Steardo, L. (2014). Sirtuin modulators control reactive gliosis in an in vitro model of Alzheimer's disease. *Front. Pharmacol.* 5, 89.
- Seeram, N.P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S.M., Feng, L., Dreher, M., and Heber, D. (2008). Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1415–1422.
- Selkoe, D.J. (2003). Aging, Amyloid, and Alzheimer's Disease: A Perspective in Honor of Carl Cotman. *Neurochem. Res.* 28, 1705–1713.
- Selkoe, D.J. (2004). Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat. Cell Biol.* 6, 1054–1061.

- Sergent, M., and Phan-Tan-Luu, R. (1989). Contribution de la méthodologie de la recherche expérimentale à l'élaboration de matrices uniformes: application aux effets de solvants et de substituants. s.n.
- Shah, N.C. (1982). Herbal folk medicines in Northern India. *J. Ethnopharmacol.* 6, 293–301.
- Sharma, O.P., and Bhat, T.K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* 113, 1202–1205.
- Sharma, S., and Singh, A. (2011). Nanotechnology Based Targeted Drug Delivery: Current Status and Future Prospects for Drug Development. *Drug Discov. Dev. - Present Future.*
- Shoeb, M., Begum, S., and Nahar, N. (2010). Study of an endophytic fungus from *Aquilaria malaccensis* Lamk. *Bangladesh J. Pharmacol.* 5, 21–24.
- Silva, A.C., González-Mira, E., García, M.L., Egea, M.A., Fonseca, J., Silva, R., Santos, D., Souto, E.B., and Ferreira, D. (2011). Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 86, 158–165.
- Singh, G.B., and Atal, C.K. (1986). Pharmacology of an extract of salai guggal ex-*Boswellia serrata*, a new non-steroidal anti-inflammatory agent. *Agents Actions* 18, 407–412.
- Singh, Y., Meher, J.G., Raval, K., Khan, F.A., Chaurasia, M., Jain, N.K., and Chourasia, M.K. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 252, 28–49.
- Sjöström, B., and Bergenståhl, B. (1992). Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate. *Int. J. Pharm.* 88, 53–62.
- Smith, M.W., and Gumbleton, M. (2006). Endocytosis at the blood–brain barrier: From basic understanding to drug delivery strategies. *J. Drug Target.* 14, 191–214.
- Smith, M.A., Harris, P.L.R., Sayre, L.M., and Perry, G. (1997). Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9866–9868.
- Soepadmo, E., Wong, K.M., and Sabah (Malaysia) (1995). Tree flora of Sabah and Sarawak (Sabah, Malaysia: Joint publication of Sabah Forestry Dept., Malaysia [and] Forest Research Institute Malaysia [and] Sarawak Forestry Dept., Malaysia).
- Sonwa, M.M., and König, W.A. (2001). Chemical study of the essential oil of *Cyperus rotundus*. *Phytochemistry* 58, 799–810.
- Sperling, R.A., Aisen, P.S., Beckett, L.A., Bennett, D.A., Craft, S., Fagan, A.M., Iwatsubo, T., Jack, C.R., Kaye, J., Montine, T.J., et al. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 7, 280–292.

- Spillantini, M.G., and Goedert, M. (1998). Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* *21*, 428–433.
- Spilovska, K., Korabecny, J., Kral, J., Horova, A., Musilek, K., Soukup, O., Drtinova, L., Gazova, Z., Siposova, K., and Kuca, K. (2013). 7-Methoxytacrine-adamantylamine heterodimers as cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease treatment--synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies. *Mol. Basel Switz.* *18*, 2397–2418.
- Spinney, L. (2014). Alzheimer's disease: The forgetting gene. *Nat. News* *510*, 26.
- Sri Harsha, P.S.C., Khan, M.I., Prabhakar, P., and Giridhar, P. (2013). Cyanidin-3-glucoside, nutritionally important constituents and in vitro antioxidant activities of *Santalum album* L. berries. *Food Res. Int.* *50*, 275–281.
- Srinivasan, V.V., Education, I.C. of F.R. and, Eng, D.D. (India), Sivaramakrishnan, V.R., Rangaswamy, C.R., Ananthapadmanabha, H.S., and Shankaranarayana, K.H. (1992). *Santalum album* L.).
- Steckel, H., and Brandes, H.G. (2004). A novel spray-drying technique to produce low density particles for pulmonary delivery. *Int. J. Pharm.* *278*, 187–195.
- Stephen, R., Hongisto, K., Solomon, A., and Lönnroos, E. (2017). Physical Activity and Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* *72*, 733–739.
- Steptoe, A., Churchill, E.P., Churchill, E.P., Todaro, M.P., Greenhalgh, S., Heidel, R., Tse, Y.C., Rosenthal, S., Vosika, M., Caldwell, J.C., et al. (2005). Socioeconomic status and coronary heart disease: A psychobiological perspective.
- Stern, Y. (2002). What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* *8*, 448–460.
- Stern, Y. (2012). Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* *11*, 1006–1012.
- Sun, J., Li, Y.-Z., Ding, Y.-H., Wang, J., Geng, J., Yang, H., Ren, J., Tang, J.-Y., and Gao, J. (2014). Neuroprotective effects of gallic acid against hypoxia/reoxygenation-induced mitochondrial dysfunctions in vitro and cerebral ischemia/reperfusion injury in vivo. *Brain Res.* *1589*, 126–139.
- Sun, W., Xie, C., Wang, H., and Hu, Y. (2004). Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain. *Biomaterials* *25*, 3065–3071.
- Sunil, A.G., Kesavanarayanan, K.S., Kalaivani, P., Sathiya, S., Ranju, V., Priya, R.J., Pramila, B., Paul, F.D.S., Venkatesh, J., and Babu, C.S. (2011). Total oligomeric flavonoids of *Cyperus rotundus* ameliorates neurological deficits, excitotoxicity and behavioral alterations induced by cerebral ischemic–reperfusion injury in rats. *Brain Res. Bull.* *84*, 394–405.
- Svilenov, H., and Tzachev, C. (2014). Solid Lipid Nanoparticles – A Promising Drug Delivery System. *51*.
- Szejtli, J. (1998). Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* *98*, 1743–1754.

- Szeto, Y.T., Wong, J.W.M., Wong, S.C.Y., Pak, S.C., and Benzie, I.F.F. (2011). DNA protective effect of ginseng and the antagonistic effect of Chinese turnip: a preliminary study. *Plant Foods Hum. Nutr. Dordr. Neth.* 66, 97–100.
- Tadros, T.F. (2013). 1 Emulsion Formation, Stability, and Rheology. p.
- Taira, J., Ikemoto, T., Yoneya, T., Hagi, A., Murakami, A., and Makino, K. (1992). Essential oil phenyl propanoids. Useful as .OH scavengers? *Free Radic. Res. Commun.* 16, 197–204.
- Takemoto, H., Ito, M., Shiraki, T., Yagura, T., and Honda, G. (2008). Sedative effects of vapor inhalation of agarwood oil and spikenard extract and identification of their active components. *J. Nat. Med.* 62, 41–46.
- Tan, Z.S., Spartano, N.L., Beiser, A.S., DeCarli, C., Auerbach, S.H., Vasan, R.S., and Seshadri, S. (2017). Physical Activity, Brain Volume, and Dementia Risk: The Framingham Study. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 72, 789–795.
- Thebtaranonth, C., Thebtaranonth, Y., Wanauppathamkul, S., and Yuthavong, Y. (1995). Antimalarial sesquiterpenes from tubers of *Cyperus rotundus*: structure of 10,12-peroxycalamenene, a sesquiterpene endoperoxide. *Phytochemistry* 40, 125–128.
- Then, F.S., Luck, T., Luppá, M., Arélin, K., Schroeter, M.L., Engel, C., Löffler, M., Thiery, J., Villringer, A., and Riedel-Heller, S.G. (2014). Association between mental demands at work and cognitive functioning in the general population – results of the health study of the Leipzig research center for civilization diseases (LIFE). *J. Occup. Med. Toxicol.* 9, 23.
- Thompson, M.A., Aberg, J.A., Hoy, J.F., Telenti, A., Benson, C., Cahn, P., Eron, J.J., Günthard, H.F., Hammer, S.M., Reiss, P., et al. (2012). Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel. *JAMA* 308, 387–402.
- Thonberg, H., Chiang, H.-H., Lilius, L., Forsell, C., Lindström, A.-K., Johansson, C., Björkström, J., Thordardottir, S., Slegers, K., Van Broeckhoven, C., et al. (2017). Identification and description of three families with familial Alzheimer disease that segregate variants in the *SORL1* gene. *Acta Neuropathol. Commun.* 5, 43.
- Thulin, M., and Warfa, A.M. (1987). The Frankincense Trees (*Boswellia* spp., Burseraceae) of Northern Somalia and Southern Arabia. *Kew Bull.* 42, 487–500.
- Thyagaraju, B.M., and Muralidhara (2008). Ferulic acid supplements abrogate oxidative impairments in liver and testis in the streptozotocin-diabetic rat. *Zoolog. Sci.* 25, 854–860.
- Town, T., Nikolic, V., and Tan, J. (2005). The microglial “activation” continuum: from innate to adaptive responses. *J. Neuroinflammation* 2, 24.
- Townsend, M., Shankar, G.M., Mehta, T., Walsh, D.M., and Selkoe, D.J. (2006). Effects of secreted oligomers of amyloid β -protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J. Physiol.* 572, 477–492.
- Tsoyi, K., Jang, H.J., Lee, Y.S., Kim, Y.M., Kim, H.J., Seo, H.G., Lee, J.H., Kwak, J.H., Lee, D.-U., and Chang, K.C. (2011). (+)-Nootkatone and (+)-valencene from rhizomes of *Cyperus*

- rotundus increase survival rates in septic mice due to heme oxygenase-1 induction. *J. Ethnopharmacol.* *137*, 1311–1317.
- Tyler, V.E., Brady, L.R., and Robbers, J.E. (1988). *Pharmacognosy* (Philadelphia: Lea & Febiger).
- Uekama, K., Hirayama, F., and Irie, T. (1998). Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chem. Rev.* *98*, 2045–2076.
- Vagelatos, N.T., and Eslick, G.D. (2013). Type 2 Diabetes as a Risk Factor for Alzheimer's Disease: The Confounders, Interactions, and Neuropathology Associated With This Relationship. *Epidemiol. Rev.* *35*, 152–160.
- Vassar, R., and Citron, M. (2000). A β -Generating Enzymes: Recent Advances in β - and γ -Secretase Research. *Neuron* *27*, 419–422.
- Vickrey, B.G., Mittman, B.S., Connor, K.I., Pearson, M.L., Della Penna, R.D., Ganiats, T.G., DeMonte, R.W., Chodosh, J., Cui, X., Vassar, S., et al. (2006). The Effect of a Disease Management Intervention on Quality and Outcomes of Dementia Care: A Randomized, Controlled Trial. *Ann. Intern. Med.* *145*, 713.
- Villemagne, V.L., Burnham, S., Bourgeat, P., Brown, B., Ellis, K.A., Salvado, O., Szoek, C., Macaulay, S.L., Martins, R., Maruff, P., et al. (2013). Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol.* *12*, 357–367.
- Voisin, T., and Vellas, B. (2009). Diagnosis and Treatment of Patients with Severe Alzheimer's Disease. *Drugs Aging* *26*, 135–144.
- Wang, F., Xie, Z.-H., Gao, Y., Xu, Y., Cheng, X.-L., and Liu, J.-K. (2008). Sulfonated guaianolides from *Saussurea lappa*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* *56*, 864–865.
- Wang, H.-X., Karp, A., Winblad, B., and Fratiglioni, L. (2002). Late-Life Engagement in Social and Leisure Activities Is Associated with a Decreased Risk of Dementia: A Longitudinal Study from the Kungsholmen Project. *Am. J. Epidemiol.* *155*, 1081–1087.
- Wang, H.-X., Xu, W., and Pei, J.-J. (2012a). Leisure activities, cognition and dementia. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1822*, 482–491.
- Wang, S., Wu, X., Tan, M., Gong, J., Tan, W., Bian, B., Chen, M., and Wang, Y. (2012b). Fighting fire with fire: poisonous Chinese herbal medicine for cancer therapy. *J. Ethnopharmacol.* *140*, 33–45.
- Wang, Y., Gao, Y., Chai, B., Chen, P., Tan, H., Zhao, Y., Xiao, C., Sun, Y., and Zhu, L. (2004). [Modulation of the activities and mRNA expression of cytochrome P450 isoenzymes in rat liver by *Panax ginseng* and coadministration with *Veratrum nigrum*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi Zhongguo Zhongyao Zazhi China J. Chin. Mater. Medica* *29*, 366–370.
- Ward, A., Crean, S., Mercaldi, C.J., Collins, J.M., Boyd, D., Cook, M.N., and Arrighi, H.M. (2012). Prevalence of Apolipoprotein E4 Genotype and Homozygotes (APOE e4/4) among Patients Diagnosed with Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology* *38*, 1–17.

- Ward, A., Tardiff, S., Dye, C., and Arrighi, H.M. (2013). Rate of Conversion from Prodromal Alzheimer's Disease to Alzheimer's Dementia: A Systematic Review of the Literature. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord. Extra* 3, 320–332.
- Wibowo, A., Ahmat, N., Hamzah, A.S., Sufian, A.S., Ismail, N.H., Ahmad, R., Jaafar, F.M., and Takayama, H. (2011). Malaysiol A, a new trimer resveratrol oligomer from the stem bark of *Dryobalanops aromatica*. *Fitoterapia* 82, 676–681.
- Willey, J.Z., Gardener, H., Caunca, M.R., Moon, Y.P., Dong, C., Cheung, Y.K., Sacco, R.L., Elkind, M.S.V., and Wright, C.B. (2016). Leisure-time physical activity associates with cognitive decline: The Northern Manhattan Study. *Neurology* 86, 1897–1903.
- Willis, B.L., Gao, A., Leonard, D., DeFina, L.F., and Berry, J.D. (2012). Midlife Fitness and the Development of Chronic Conditions in Later Life. *Arch. Intern. Med.* 172, 1333–1340.
- Wills, R.B.H., Bone, K., and Morgan, M. (2000). Herbal products: active constituents, modes of action and quality control. *Nutr. Res. Rev.* 13, 47–77.
- Wimo, A., Winblad, B., and Jönsson, L. (2010). The worldwide societal costs of dementia: Estimates for 2009. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 6, 98–103.
- Wirhth, O., Bethge, T., Marcello, A., Harmeier, A., Jawhar, S., Lucassen, P.J., Multhaup, G., Brody, D.L., Esparza, T., Ingelsson, M., et al. (2010). Pyroglutamate Abeta pathology in APP/PS1KI mice, sporadic and familial Alzheimer's disease cases. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 117, 85–96.
- Wissing, S.A., and Müller, R.H. (2002). The influence of the crystallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties. *Int. J. Pharm.* 242, 377–379.
- Wong, C.W., Quaranta, V., and Glenner, G.G. (1985). Neuritic plaques and cerebrovascular amyloid in Alzheimer disease are antigenically related. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 8729–8732.
- World Alzheimer Report (2018). World Alzheimer Report 2018 - The state of the art of dementia research: New frontiers. *NEW Front.* 48.
- Wu, H., Shu, W., Qiu, L., and Ye, D. (1998). [The experiment research of ginger detoxification to *Rhizoma Pinelliae*]. *Zhong Yao Cai Zhongyaocai J. Chin. Med. Mater.* 21, 137–140.
- Wu, W., Brickman, A.M., Luchsinger, J., Ferrazzano, P., Pichiule, P., Yoshita, M., Brown, T., DeCarli, C., Barnes, C.A., Mayeux, R., et al. (2008). The brain in the age of old: The hippocampal formation is targeted differentially by diseases of late life. *Ann. Neurol.* 64, 698–706.
- Xie, Z. (2000). *Practical Traditional Chinese Medicine* (Beijing: waiwen chubanshe).
- Yaesh, S., Jamal, Q., Shah, A.J., and Gilani, A.H. (2010). Antihepatotoxic activity of *Saussurea lappa* extract on D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatitis in mice. *Phytother. Res.* 24, S229–S232.

- Yamamoto, K., Ueta, Y., Wang, L., Yamamoto, R., Inoue, N., Inokuchi, K., Aiba, A., Yonekura, H., and Kato, N. (2011). Suppression of a Neocortical Potassium Channel Activity by Intracellular Amyloid- β and Its Rescue with Homer1a. *J. Neurosci.* *31*, 11100–11109.
- Yang, H.L., Chang, W.H., Chia, Y.C., Huang, C.J., Lu, F.J., Hsu, H.K., and Hseu, Y.C. (2006). Toona sinensis extracts induces apoptosis via reactive oxygen species in human premyelocytic leukemia cells. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* *44*, 1978–1988.
- Yang, S., Zhu, J., Lu, Y., Liang, B., and Yang, C. (1999a). Body Distribution of Camptothecin Solid Lipid Nanoparticles After Oral Administration. *Pharm. Res.* *16*, 751–757.
- Yang, S.C., Lu, L.F., Cai, Y., Zhu, J.B., Liang, B.W., and Yang, C.Z. (1999b). Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. *J. Controlled Release* *59*, 299–307.
- Yatin, S.M., Varadarajan, S., Link, C.D., and Butterfield, D.A. (1999). In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42). *Neurobiol. Aging* *20*, 325–330; discussion 339-342.
- Yoon, J.-H., Youn, K., Ho, C.-T., Karwe, M.V., Jeong, W.-S., and Jun, M. (2014). p-Coumaric acid and ursolic acid from Corni fructus attenuated β -amyloid(25-35)-induced toxicity through regulation of the NF- κ B signaling pathway in PC12 cells. *J. Agric. Food Chem.* *62*, 4911–4916.
- Yusuf, M., Khan, M., Khan, R.A., and Ahmed, B. (2013). Preparation, characterization, in vivo and biochemical evaluation of brain targeted Piperine solid lipid nanoparticles in an experimentally induced Alzheimer's disease model. *J. Drug Target.* *21*, 300–311.
- Zahara, K., Tabassum, S., Sabir, S., Arshad, M., Qureshi, R., Amjad, M.S., and Chaudhari, S.K. (2014). A review of therapeutic potential of Saussurea lappa-An endangered plant from Himalaya. *Asian Pac. J. Trop. Med.* *7*, S60–S69.
- Zhang, J., Lv, C., Wang, H., and Cao, Y. (2013). Synergistic interaction between total glucosides and total flavonoids on chronic constriction injury induced neuropathic pain in rats. *Pharm. Biol.* *51*, 455–462.
- Zhang, T., Ma, L., Wu, F., and Chen, R. (2012). [Chemical constituents from a portion of ethanolic extract of Saussurea lappa roots]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi Zhongguo Zhongyao Zazhi China J. Chin. Mater. Medica* *37*, 1232–1236.
- Zhang, X., Chen, W., Guillermo, R., Chandrasekher, G., Kaushik, R.S., Young, A., Fahmy, H., and Dwivedi, C. (2010). Alpha-santalol, a chemopreventive agent against skin cancer, causes G2/M cell cycle arrest in both p53-mutated human epidermoid carcinoma A431 cells and p53 wild-type human melanoma UACC-62 cells. *BMC Res. Notes* *3*, 220.
- Zhao, F., Xu, H., He, E.-Q., Jiang, Y.-T., and Liu, K. (2008). Inhibitory effects of sesquiterpenes from Saussurea lappa on the overproduction of nitric oxide and TNF-alpha release in LPS-activated macrophages. *J. Asian Nat. Prod. Res.* *10*, 1045–1053.

Zhao, W., Entschladen, F., Liu, H., Niggemann, B., Fang, Q., Zaenker, K.S., and Han, R. (2003). Boswellic acid acetate induces differentiation and apoptosis in highly metastatic melanoma and fibrosarcoma cells. *Cancer Detect. Prev.* 27, 67–75.

Zheng, G.Q., Kenney, P.M., and Lam, L.K. (1992). Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *J. Nat. Prod.* 55, 999–1003.

Zhong, L.-Y., Wu, H., Zhang, K.-W., and Wang, Q.-R. (2006). [Study on irritation of calcium oxalate crystal in raw *Pinellia ternata*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi Zhongguo Zhongyao Zazhi China J. Chin. Mater. Medica* 31, 1706–1710.

Zhu, F., Yu, H., Wu, H., Shi, R., Tao, W., and Qiu, Y. (2012). [Correlation of *Pinellia ternata* agglutinin and *Pinellia ternata* raphides' toxicity]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi Zhongguo Zhongyao Zazhi China J. Chin. Mater. Medica* 37, 1007–1011.

Zhu, M., Luk, H.H., Fung, H.S., and Luk, C.T. (1997). Cytoprotective effects of *Cyperus rotundus* against ethanol induced gastric ulceration in rats. *Phytother. Res.* 11, 392–394.

Zlokovic, B.V. (2008). The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron* 57, 178–201.

(2016). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications* (Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group).