

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
GENEVIÈVE BUREAU**

**DEUX PHYTO-ESTROGÈNES, LE RESVÉRATROL
ET LA QUERCÉTINE, RÉDUISENT LA MORT NEURONALE
INDUITE PAR LE STRESS OXYDATIF ET L'INFLAMMATION**

OCTOBRE 2006

AVANT-PROPOS

Depuis plusieurs années déjà, les sciences m'intéressent car c'est un monde rempli de nouveaux défis. Plus la recherche progresse, plus on s'aperçoit qu'il y a de nouvelles choses à découvrir. C'est très stimulant de faire de la recherche pour tenter d'améliorer la qualité de vie des humains et en venir à traiter des maladies qui étaient autrefois incurables. C'est ainsi que j'ai débuté mes études au Collège Shawinigan en technique de chimie-biologie. Le Dr Martinoli m'a accueilli dans son laboratoire de neurobiologie cellulaire pour mon stage de fin de technique. J'ai tout de suite adoré le sujet de recherche et j'ai développé deux nouvelles passions : le travail en laboratoire et l'étude du cerveau. J'ai toujours été surprise et émerveillée de constater comment le corps était bien régi. Mais lorsqu'on s'attarde au cerveau, à son fonctionnement et à toutes ses complexités, on ne peut que vouloir en savoir davantage. C'est pourquoi j'ai décidé de faire mon projet de maîtrise dans le laboratoire du Dr Martinoli, dans le cadre de la maladie de Parkinson, qui est une maladie incurable pour laquelle il n'existe que des traitements symptomatiques efficaces pour quelques années seulement. Je crois qu'il est important de s'investir dans la recherche sur les maladies neurodégénératives en ces temps où la population est vieillissante et où l'incidence de ces maladies ne cessera d'augmenter.

J'aimerais remercier des gens qui de près ou de loin ont contribué à embellir ma vie de laboratoire. Tout d'abord, je tiens à remercier grandement le Dr Maria-Grazia Martinoli pour la confiance qu'elle m'a accordée depuis mon entrée au laboratoire. J'ai beaucoup apprécié la grande liberté qu'elle me laissait dans le développement de mon projet de recherche et aussi sa grande disponibilité. Je tiens aussi à remercier Keith Chiasson qui a eu la patience de m'enseigner tous les rudiments du laboratoire et avec qui j'ai beaucoup aimé travailler. Je porte une attention spéciale à Vicky Lahaie-Collins, Julie Bournival et Julie Blanchet, qui m'ont aidé dans mes manipulations et avec qui j'ai passé de belles heures au laboratoire. Je voudrais aussi remercier tous mes amis des autres laboratoires qui, d'un conseil ou d'un simple sourire, ont agrémenté ma vie. J'ai une pensée spéciale à mes parents, qui ont toujours été présents et ont toujours eu confiance en moi. Merci à vous tous...

RÉSUMÉ

L'étiologie de la maladie de Parkinson demeure toujours inconnue, mais plusieurs facteurs seraient impliqués dans le déclenchement de la maladie de Parkinson comme dans la progression de la maladie de Parkinson. Les phénomènes de stress oxydatif et de neuroinflammation semblent être les joueurs majoritairement impliqués dans le déclenchement de la maladie de Parkinson. L'état de stress oxydatif, retrouvé lors d'une surproduction de radicaux libres, engendre la mort neuronale par apoptose. Le système immunitaire du cerveau a la capacité de produire des cytokines pro-inflammatoires qui peuvent causer, par l'inflammation, la mort des neurones environnants par apoptose. Même s'il existe à ce jour certains traitements symptomatiques de la maladie de Parkinson, ils ne sont efficaces que sur une courte durée et ils causent plusieurs effets secondaires. Alors une stratégie possible est d'identifier des molécules capables de réduire la quantité de radicaux libres dans le cerveau et qui possèdent, en plus, des propriétés anti-inflammatoires, sans toutefois causer des effets secondaires néfastes. Des études antérieures de notre laboratoire ont démontré le pouvoir antioxydant de certains phyto-estrogènes, molécules naturellement produites chez la plante et très similaires aux estrogènes par leur structure chimique. Deux phyto-estrogènes retrouvés dans l'alimentation quotidienne qui ont présenté de très bonnes capacités antioxydantes sont le resvératrol et la quercétine. Le but de mon projet de maîtrise était d'abord de vérifier *in vitro* si le resvératrol et la quercétine sont capables de réduire la mort neuronale par apoptose. Une seconde avenue de mon projet de maîtrise consistait à étudier le pouvoir anti-inflammatoire du resvératrol et de la quercétine sur la microglie en culture et de vérifier si cette action permettait de réduire la mort neuronale apoptotique.

Ce mémoire se doit donc de faire une revue complète sur la maladie de Parkinson et des phénomènes de stress oxydatif et de neuroinflammation pour permettre une bonne compréhension de la problématique de recherche et de l'implication des résultats. Mes résultats ont permis de conclure que le resvératrol et la quercétine permettent de réduire le niveau d'apoptose des neurones induit soit par le stress oxydatif, soit par la neuroinflammation. Ainsi, un traitement avec ces phyto-estrogènes pourrait servir à titre de traitement préventif pour la maladie de Parkinson ou, lorsque combiné aux traitements actuels, permettrait d'améliorer leur efficacité et la qualité de vie des patients.

Mots clés

Neuroprotection, maladie de Parkinson, stress oxydatif, neuroinflammation, apoptose, resvératrol, quercétine, RT-PCR, immuno-fluorescence, lactate déshydrogénase

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	ii
RÉSUMÉ	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 La maladie de Parkinson (MP).....	1
1.1.1 Prévalence de la maladie.....	1
1.1.2 Symptômes cliniques	2
1.1.4 Description neurophysiologique de la MP	3
1.1.5 Description neuropathologique de la MP.....	5
1.1.5.1 Présence de corps de Lewy (CL)	5
1.1.1.6 Perte de la pigmentation neuromélanique	6
1.2 Les causes de la MP	7
1.2.1 La MP héréditaire.....	7
1.2.1.1 Gène de l'α-synucléine	8
1.2.1.2 Gène de la dardarine.....	9
1.2.1.3 Gène de la parkine.....	9
1.2.1.4 Gène DJ1	9
1.2.1.5 Gène PINK1	10
1.2.2 La MP idiopathique.....	11
1.2.2.1 Le stress oxydatif	11
1.2.2.2 Les radicaux libres endogènes	11
1.2.2.3 Les radicaux libres exogènes	13
1.2.2.4 Les cibles du stress oxydatif	13
1.2.2.5 Le processus de mort apoptotique : un résultat du stress oxydatif.....	15
1.2.2.6 Les défenses antioxydantes de la cellule.....	16
1.2.2.7 Altérations dans la MP favorisant le stress oxydatif.....	18
1.2.3 Le rôle de l'inflammation dans la MP.....	24
1.2.3.1 Le système immunitaire du cerveau.....	25
1.2.3.3 Rôle protecteur des cellules gliales dans la MP	30
1.2.3.4 Implication de la neuroinflammation dans la MP	31
1.2.3.5 Modèles pour l'étude de l'inflammation dans la MP.....	32
1.3 Les thérapies de la MP	35
1.3.1 Les traitements chirurgicaux de la MP.....	35
1.3.1.1 La pallidotomie et la thalamotomie.....	35
1.3.1.2 Stimulation cérébrale profonde (SCP)	37
1.3.2 Les traitements médicamenteux de la MP	38
1.3.2.1 La dopathérapie.....	38
1.3.2.2 Les agonistes DAergiques.....	39
1.3.3 Les thérapies préventives	40

1.3.3.1	Les estrogènes (E).....	41
1.3.3.2	Le resvératrol	45
1.3.3.3	La quercétine.....	50
1.4	Hypothèses et objectifs de recherche	52
CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		54
2.1	Matériel utilisé pour l'objectif # 1	54
2.2	Traitement des cellules.....	54
2.3	Mesure du niveau de mort cellulaire.....	56
2.4	Marquage des cellules en apoptose	57
2.5	Matériel utilisé pour l'objectif # 2	58
2.6	Traitements de cellules.....	59
2.7	Étude de l'expression de deux gènes pro-inflammatoires par RT-PCR	60
2.8	Système de co-culture	61
2.9	Tests statistiques.....	63
CHAPITRE 3 RÉSULTATS		64
3.1	Dose-réponse du MPP ⁺ pour l'induction de l'apoptose sur les PC12.....	64
3.2	Effet du resvératrol et de la quercétine sur la mort cellulaire induite par le MPP ⁺ , sur les cellules PC12.....	64
3.3	Effet du resvératrol et de la quercétine sur l'apoptose induite par le MPP ⁺ , sur les cellules PC12.....	65
3.4	Dose-réponse de l'induction de l'inflammation par le LPS sur les cellules N9 ...	67
3.5	Effet du resvératrol et de la quercétine sur le niveau d'expression de IL-1 α et TNF- α activés par le LPS.....	68
3.6	Effet du LPS sur les cellules PC12 directement.....	71
3.7	Effet de la microglie activée au LPS sur la mort cellulaire des PC12 dans un système de co-culture	71
3.8	Effet de la microglie activée au LPS sur le processus d'apoptose des PC12.....	72
CHAPITRE 4 CONCLUSIONS		76
BIBLIOGRAPHIE.....		80

LISTE DES FIGURES

1.1 : MARQUAGE DE LA F-DOPA EN PET-SCAN.....	4
1.2 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA VOIE NIGRO-STRIÉE	4
1.3: MARQUAGE DES CORPS DE LEWY.....	5
1.4: PERTE DES NEURONES DAERGSIQUES DANS LA MP.....	6
1.5: RÉSUMÉ DES MUTATIONS GÉNÉTIQUES IMPLIQUÉES DANS LA MP HÂTIVE ..	10
1.6: MÉTABOLISME DE LA DA	13
1.7: ATTAQUE DE L'ADN PAR LE RADICAL HYDROXYLE	15
1.8: ÉTAPES FINALES DU PROCESSUS D'APOPTOSE.	16
1.9: TRANSFORMATION DU MPTP EN MPP ⁺	21
1.10: MÉCANISME D'ACTION DU MPP ⁺	21
1.11: AUGMENTATION DU TURNOVER DE LA DA DANS LA MP	23
1.12: RÉSUMÉ DES SOURCES DE RADICAUX LIBRES ET DES DÉFENSES	24
1.13: PRODUCTION DES DIFFÉRENTS FACTEURS PRO-INFLAMMATOIRES.....	27
1.14: PROCESSUS D'ACTIVATION DE NF-KB.....	29
1.15: MODES D'ACTION DE TNF- α ET D'IL-1	29
1.16: BOUCLE D'AMPLIFICATION DE LA MORT NEURONALE DANS LA MP	32
1.17: DIFFÉRENTS MODÈLES POUR L'ÉTUDE DE LA NEUROTOXICITÉ	33
1.18 : MODE D'ACTION DU LPS.	34
1.19: CHIRURGIES POUR LE TRAITEMENT DE LA MP.....	36
1.20: SCHÉMA DE LA SCP.....	37
1.21: FORMATION DE LA DA À PARTIR DE LA L-DOPA.....	38
1.22: STRUCTURE CHIMIQUE DE L'ESTRADIOL.....	42
1.23: RÉSUMÉ DES MÉCANISMES DE PROTECTION DES ESTROGÈNES	44
1.24: STRUCTURE CHIMIQUE DU TRANS- ET CIS-RESVÉRATROL.....	46
1.25: VOIE DE BIOSYNTHÈSE DU RESVÉRATROL CHEZ LA PLANTE.....	46
1.26: POUVOIR ANTI-CANCÉREUX DU RESVÉRATROL.....	48
1.27: STRUCTURE CHIMIQUE DE LA QUERCÉTINE.	50
1.28: STRUCTURE CHIMIQUE DU TROLOX.....	51
1.29: VALEUR DES ACTIVITÉS ANTIOXYDANTES ÉQUIVALENTES AU TROLOX	51
2.1 : CELLULES PC12	55
2.2 : PÉRIODE DE TRAITEMENTS DES CELLULES PC12.....	56
2.3 : RÉACTION COLORIMÉTRIQUE DU DOSAGE DE LA LDH.....	57

2.4 : SCHÉMATISATION DE LA TECHNIQUE DE TUNEL	58
2.5 : CELLULES MICROGLIALES N9.	59
2.6 : RÉCEPTEURS DE SURFACE ÉTUDIÉS CHEZ LES CELLULES N9	60
2.7: SÉQUENCES DES SONDÉS UTILISÉES POUR LE PCR.	61
2.8 : SCHÉMA DE LA CO-CULTURE DES CELLULES N9 ET DE PC12.	62
2.9 : TRAITEMENTS POUR LA CO-CULTURE DES CELLULES N9 ET DES PC12.	63
3.1 : DOSE RÉPONSE DU MPP ⁺ POUR INDUIRE DE L' APOPTOSE SUR LES PC12.....	64
3.2 : MESURE DE LA MORT CELLULAIRE DES CELLULES PC12.....	65
3.3 : MARQUAGE DES NOYAUX EN APOPTOSE DES PC12 SUITE AU MPP ⁺	66
3.4 : DÉCOMPTE DES PC12 EN APOPTOSE SUITE AU TRAITEMENT AU MPP ⁺	66
3.5 : NIVEAU D'EXPRESSION DE IL-1 α DES N9 À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE LPS	67
3.6 : NIVEAU D'EXPRESSION DE TNF- α DES N9 À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE LPS	68
3.7 : NIVEAU D'EXPRESSION D'IL- α DES N9 SANS PRÉ-TRAITEMENT AUX PHYTO- ESTROGÈNES.....	68
3.8 : NIVEAU D'EXPRESSION DE TNF- α DES N9 SANS PRÉ-TRAITEMENTS AUX PHYTO-ESTROGÈNES	69
3.9 : NIVEAU D'EXPRESSION DE IL-1 α SUITE AU PRÉ-TRAITEMENT AUX PHYTO- ESTROGÈNES.....	70
3.10 : NIVEAU D'EXPRESSION DE TNF- α SUITE AU TRAITEMENT AUX PHYTO- ESTROGÈNES.....	70
3.11: MESURE DE LA MORT CELLULAIRE DES PC12 TRAITÉES DIRECTEMENT AU LPS	71
3.12 : MESURE DE LA MORT CELLULAIRE DES PC12 INDUITE PAR LA MICROGLIE ACTIVÉE (CO-CULTURE)	72
3.13: MARQUAGE DES PC12 EN APOPTOSE INDUITE PAR LA MICROGLIE ACTIVÉE AU LPS.....	73
3.14 : MESURE DE LA MORT CELLULAIRE DES PC12 SUITE À LA CO-CULTURE AVEC DE LA MICROGLIE TRAITÉE AUX PHYTO-ESTROGÈNES ET AU LPS.....	74
3.15 : MARQUAGE DES NOYAUX DE PC12 EN APOPTOSE SUITE À LA CO-CULTURE AVEC LA MICROGLIE TRAITÉE AUX PHYTO-ESTROGÈNES ET AU LPS	75
3.16 : DÉCOMPTE DES CELLULES PC12 EN APOPTOSE SUITE À	75

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α -KGDH	α -kétoglutarate déshydrogénase
BDNF	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
BHE	Barrière hémato-encéphalique
Cat	Catalase
CL	Corps de Lewy
COX	Cyclooxygénase
DA	Dopamine
DAT	Transporteur de la dopamine
DC	Dopa décarboxylase
E	Estrogène
ER	Récepteur estrogène
ERE	Élément de réponse aux estrogènes
FBS	Sérum bovin fœtal
GDNF	Facteur neurotrophique dérivé de la glie
GFAP	Protéine fibrillaire acide de la glie
GPx	Glutathione peroxydase
GSH	Glutathione
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
4-HNE	4-hydroxynonéanal
HS	Sérum de cheval
IDC	Inhibiteur de la dopa décarboxylase
IL-1 α/β	Interleukine-1 α/β
iNOS	Synthase d'oxyde nitrique
LDH	Lactate déshydrogénase
L-DOPA	levodopa
LPS	Lipopolysaccharide
MAO-B	Monoamine oxydase B
MP	Maladie de Parkinson
MPP ⁺	1-méthyl-4-phénylpyridinium
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,5,6-tétrahydropyridine

NGF	Facteur de croissance du nerf (<i>nerve growth factor</i>)
NO	Oxyde nitrique
NSAID	Anti-inflammatoire non stéroïdien
O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde
OH [•]	Radical hydroxyle
PET-Scan	Scan de tomographie par émission de positron
PGE	Prostaglandine E
RT	Transcription Réverse
SCP	Stimulation cérébrale profonde
SNC	Substance noire <i>compacta</i>
SOD	Superoxyde dismutase
TdT	Transférase de déoxynucléotides terminaux
TEAC	Activité antioxydante équivalente au Trolox
TH	Tyrosine hydroxylase
TNF- α	Facteur tumoral de nécrose α
TUNEL	Marquage aux bouts tronqués terminaux des dUTP

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 La maladie de Parkinson (MP)

James Parkinson fut le premier médecin à décrire la MP en 1817. Il l'a décrite à l'époque comme la « paralysie agitante » dans son ouvrage « *Essay on shaking palsy* ». Le médecin britannique s'était alors basé sur 6 patients pour émettre ses premières observations pionnières des symptômes de la MP (1). Il n'en demeure pas moins que la première percée importante dans la MP fut réalisée par Ehringer et Hornykiewicz en 1960 (2). Les auteurs avaient reçu les striatums de patients atteints de la MP et d'autres de sujets sains pour comparer les niveaux de dopamine (DA). Ils rapportèrent un déficit marqué en DA dans les cerveaux de patients atteints de la MP, comparativement au niveau de DA présent dans les cerveaux sains (3). De nos jours, on connaît bien la MP, ses caractéristiques post mortem, ses symptômes, le diagnostic, mais l'étiologie de la maladie demeure toutefois inconnue.

1.1.1 Prévalence de la maladie

La MP est une maladie progressive où l'âge moyen de l'apparition des symptômes est de 55 ans. Elle affecte 1 % de la population de plus de 65 ans mais son incidence augmente rapidement après 70 ans. La Société Parkinson Canada estime à 100 000 le nombre de Canadiens atteint de la MP. C'est la deuxième maladie neurodégénérative affectant le plus d'individus après la maladie d'Alzheimer.

En 1999, Santé Canada publiait une compilation statistique sur les facteurs pouvant contribuer au développement de la MP. On peut compter parmi ceux-ci l'environnement, la race des personnes et le sexe (4). Plusieurs études ont tenté de mettre en évidence la relation entre le développement de la MP et le travail agricole (5). Une méta-analyse a été réalisée en 2001 pour cumuler plusieurs études épidémiologiques qui ont étudié le risque de développer la MP et l'exposition aux pesticides, la vie rurale, l'agriculture et le

fait de boire l'eau de puits (5, 6). De toute évidence, les auteurs rapportent que les agriculteurs sont beaucoup plus en contact avec des produits neurotoxiques (pesticides, insecticides) et risquent davantage de développer la MP. D'ailleurs, les divers modèles les plus utilisés pour étudier la MP *in vivo* et *in vitro* sont très souvent des pesticides ou herbicides qui ont été utilisés ou qui sont toujours utilisés en agriculture. La section 1.2.3.5 fait une revue des différents modèles pour l'étude de la MP.

La race des personnes influence aussi beaucoup le risque de développer la MP. Une étude faite sur la distribution de la MP dans le monde a démontré que le plus grand nombre de personnes atteintes se trouvaient en Uruguay, tandis que la proportion la plus faible se trouvait en Chine (7). Ces écarts entre les populations peuvent provenir de multiples sources, dont les habitudes alimentaires, l'âge moyen de vie et la pollution.

Finalement, beaucoup plus d'hommes sont affectés par la MP que les femmes (8). En effet, les femmes possèdent une hormone féminine, l'estrogène (E), qui pourrait avoir des bienfaits pour prévenir, entre autre, l'apparition de la MP (9). Une section complète, dans ce mémoire, est réservée aux bienfaits des E contre les maladies du vieillissement, dont la MP.

1.1.2 Symptômes cliniques

La MP n'affecte pas tous les patients de la même façon. Elle peut évoluer lentement ou rapidement, selon les individus et chacun peut avoir quelques symptômes associés à la maladie sans toutefois tous les développer. Les trois principaux symptômes de la maladie sont les tremblements au repos, la rigidité musculaire et la bradykinésie/akinésie (10).

Les **tremblements au repos** surviennent surtout au niveau des mains, des bras et de la tête. C'est très souvent grâce à ce symptôme qu'un patient découvre qu'il a la MP et malheureusement, c'est celui qui le gêne le plus souvent.

La **rigidité** musculaire affecte la plupart des parkinsoniens et empêche les mouvements fluides. De plus, cela mène très souvent à la perte d'expressions faciales.

L'**akinésie**, qui est la privation de mouvement, rend parfois les mouvements volontaires très difficiles à réaliser et mène aussi, au stade avancé de la maladie, à l'interruption d'un mouvement en cours. La **bradykinésie**, quant à elle, se traduit par une lenteur des mouvements et affecte beaucoup les activités de tous les jours (s'habiller, se laver). Elle se manifeste aussi par un retard dans l'amorce du mouvement.

Pour le diagnostic de la maladie, deux de ces trois symptômes doivent être retrouvés, mais le diagnostic final ne se fait qu'à l'autopsie, par la mise en évidence des corps de Lewy dans le mésencéphale (voir la section 1.1.5.1). D'autres symptômes peuvent aussi être retrouvés chez les patients atteints de la MP. Par exemple, plus de 50% des patients sont atteints de dépression sévère et parfois même il peut y avoir des signes de démence (11).

1.1.4 Description neurophysiologique de la MP

La MP est une maladie neurodégénérative qui est caractérisée par une perte sélective des neurones DAergiques de la substance noire *compacta* (SNc), ce qui mène à une diminution de la production de DA (voir figure 1.1). Ces neurones font parties d'une boucle de rétroaction qui gère les activités motrices, la voie nigro-striée.

En temps normal, le corps cellulaire des neurones DAergiques de la SNc projette ses afférences vers le striatum qui innervent les neurones possédant les récepteurs DAergiques. Une série d'interactions subséquentes mène finalement à l'innervation des cellules musculaires. Cette boucle de rétroaction est bien régie pour contrôler parfaitement les mouvements volontaires (12). La figure 1.2 schématise la voie nigro-striée fonctionnelle. Dans le cas d'un patient atteint de la MP, il y a une destruction massive des neurones DAergiques de la SNc et il s'en suit une altération de l'innervation

du striatum. Le contrôle final sur les cellules musculaires est donc déséquilibré, ce qui conduit aux troubles locomoteurs associés à la MP.

Les premiers symptômes de la maladie apparaissent lors de la dégénérescence de plus de 50% des neurones DAergiques de la SNc (13). Il ne va pas sans dire que cette situation est irréversible et qu' il est impossible de régénérer ces neurones jusqu'à maintenant.

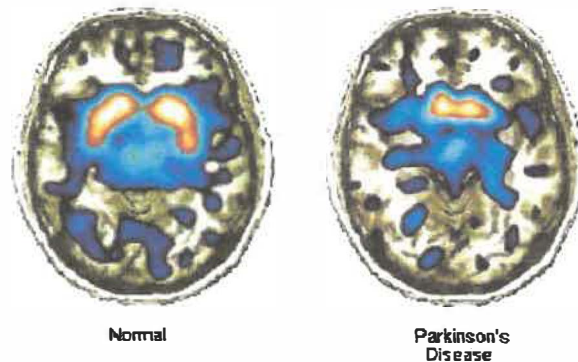


FIGURE 1.1 : Marquage de la F-DOPA en PET-scan
À gauche : un cerveau sain. À droite :
un cerveau de patient.

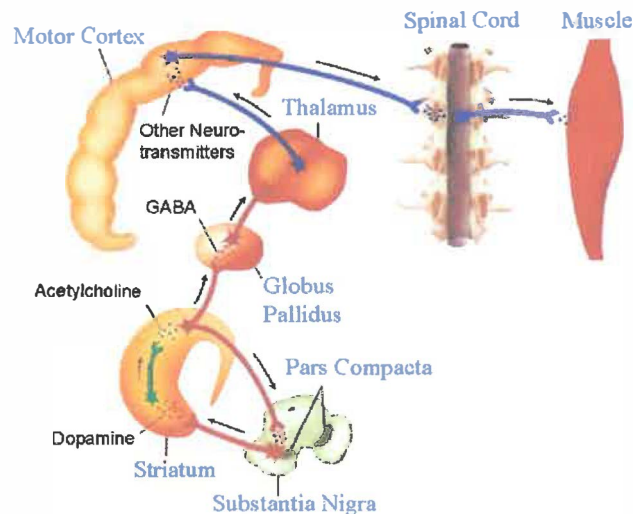


FIGURE 1.2 : Représentation schématique de la voie
nigro-striée normale

1.1.5 Description neuropathologique de la MP

Même si le diagnostic clinique de la MP peut être possible par la présence de deux des trois symptômes principaux de la maladie, le diagnostic final ne se fait qu'à l'autopsie.

1.1.5.1 Présence de corps de Lewy (CL)

Les CL sont des inclusions éosinophiles intra-cytoplasmiques rondes retrouvées dans la SNc. Les CL ne sont pas spécifiques à la MP, on peut aussi les retrouver dans la maladie d'Alzheimer et dans la démence associée aux CL (14). Toutefois, la présence de CL dans la SNc du mésencéphale est exclusive à la MP (15). Les CL sont des enchevêtrements protéiques et marquent positivement à l'ubiquitine (une protéine impliquée dans la protéolyse). La figure 1.3 montre des CL en microscopie optique suite à une coloration hématoxyline/ éosine.

Certaines protéines mutées, comme l' α -synucléine et DJ-1, peuvent s'accumuler dans les CL et leur implication dans la MP sera traitée de façon plus exhaustive dans la section 1.2.1. La provenance des CL est incertaine et on ne sait toujours pas s'ils sont la cause ou la conséquence de la MP. En effet, est-ce les dommages au système DAergique qui entraînent l'agrégation de certaines protéines et la formation des CL ou bien est-ce la présence des CL qui entraîne la dégénérescence du système DAergique? La question demeure un mystère pour l'instant.

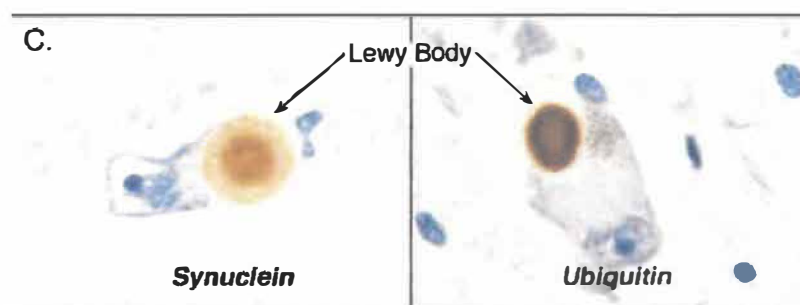


FIGURE 1.3: Marquage générale des neurones au crésyl violet et détection des CL.
À gauche : Immuno-détection des CL avec un marquage à l'anticorps contre l' α -synucléine (on voit une zone centrale réactive intense avec un halo diffus). À droite : Immuno-détection des CL avec un marquage à l'anticorps contre l'ubiquitine (13)

1.1.1.6 Perte de la pigmentation neuromélanique

Dans les années 1930, on dénota la présence de granules pigmentés bruns/noirs dans le système nerveux central humain, plus précisément dans la SN et le locus coeruleus (16). Après plusieurs études histologiques, on décrivit la ressemblance de ces granules à la mélanine (insolubilité dans des solvants organiques et blanchiment au peroxyde d'hydrogène). Ce pigment fut par la suite nommé, neuromélanine. Les pigments neuromélaniques sont entourés d'une double membrane, se localisent dans le péricaryon neuronal et leur accumulation dans la SNc pourrait être causée par le vieillissement. En effet, la provenance de la neuromélanine fut longuement étudiée. Elle pourrait provenir, entre autre, de l'auto-oxydation de la DA en présence d'oxygène (17). Lors de la dégénérescence des neurones DAergiques neuromélaniques associée à la MP, il y a donc une diminution de la pigmentation dans la SN qui est observable lors de l'autopsie. La figure 1.4 démontre bien la perte de pigmentation neuromélanique de la SN dans le cas de parkinsoniens. On demeure cependant incertain du rôle de la neuromélanine dans le développement de la MP. En fait, la neuromélanine pourrait servir de réservoir pour certaines toxines et permettrait aussi à certains métaux de transitions impliqués dans la MP de s'y loger, ce qui pourrait expliquer une neurotoxicité spécifique de certaines toxines, comme le 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP^+) (18).

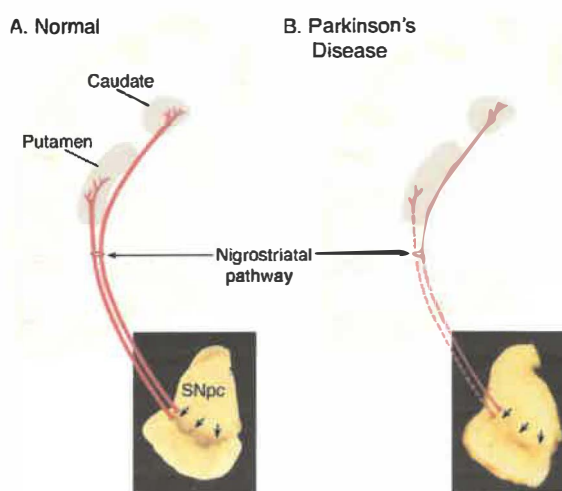


FIGURE 1.4: Perte des neurones DAergiques neuromélaniques de la SN dans la MP.
À droite : cerveau de patient atteint de la MP. À gauche : cerveau de patient normal (13).

1.2 Les causes de la MP

Au tout début de l'étude sur la MP, les chercheurs croyaient que cette maladie pouvait avoir pour cause des défauts génétiques causant l'agrégation de certaines protéines dans les CL. Cependant, après l'étude exhaustive de cette possibilité, on a vite constaté que la proportion des patients ayant une forme héréditaire de la MP représentait seulement 5% des cas. Même si plusieurs études tentent toujours de démystifier la cause de la MP, une des explications les plus approuvées à ce jour est la théorie du stress oxydatif voulant que la dégénérescence des neurones DAergiques soit causée par l'accumulation de radicaux libres (forme idiopathique de la MP). Aussi, une des approches de plus en plus en vogue depuis quelques années est le rôle de l'inflammation dans la dégénérescence des neurones DAergiques. De toutes ces hypothèses qui comptent chacune de nombreux fidèles, on ne peut cependant toujours pas savoir si toutes ces observations sont la cause de la MP ou bien une conséquence de la MP. La situation est comparable à la populaire question qui n'a toujours pas de réponse : « Qu'est-il apparu en premier l'œuf ou la poule? ». En fait, il semblerait que certaines personnes sont plus vulnérables génétiquement aux effets néfastes du stress oxydatif et aux dommages inflammatoires. Dans les sections à venir, une revue complète de chacune des théories sera présentée, puisqu'elles sont toutes intimement liées.

1.2.1 La MP héréditaire

Les formes idiopathique et héréditaire de la MP sont très similaires d'un point de vue clinique et pathologique, mais la forme héréditaire se développe souvent plus tôt, vers l'âge de 45-50 ans, et certains signes particuliers cliniques peuvent y être associés. Par exemple, dans certains cas, les tremblements sont moins intenses, l'évolution peut être moins rapide et la démence y est plus souvent associée (19). Depuis 1997, les généticiens ont réussi à identifier des mutations importantes de 5 principaux gènes qui pourraient être responsables de la MP dans des familles où l'incidence de la maladie est très élevée (20).

1.2.1.1 Gène de l' α -synucléine

Le premier gène à avoir été caractérisé pour ses implications dans la MP héréditaire est PARK1. Ce gène est responsable de la formation de la protéine présynaptique α -synucléine, impliquée dans la plasticité neuronale. Trois mutations autosomales-dominantes sur le chromosome 4q21 furent principalement identifiées, mais elles ne modifient pas la protéine au niveau fonctionnelle, mais plutôt de manière quantitative. Le gène muté est dupliqué (21) et même tripliqué (22), ce qui entraîne la production d'une plus grande quantité de la protéine comparativement à la protéine normale, ce qui mène à son agrégation. Le marquage des CL avec un anticorps contre l' α -synucléine agrégée montre une forte immunoréactivité, signe de la présence de la protéine dans les CL et donc suggère son implication dans la MP (23). Aucune de ces mutations ne fut identifiée dans la forme idiopathique de la MP.

La présence d' α -synucléine agrégée a un effet neurotoxique sur les neurones DAergiques. Des chercheurs ont mis en contact un peptide de l' α -synucléine agrégée en présence de culture primaire de neurones DAergiques. Après 4 jours, il y avait une toxicité importante induite sur ces neurones (24). De plus, une autre équipe de chercheurs a créé une souris portant différentes mutations sur l' α -synucléine. La souris ne démontrait pas un phénotype parkinsonnien, mais elle présentait une réduction marquée du taux striatal de DA démontrant que, lorsque cette protéine n'est pas fonctionnelle, il y a des dommages au système DAergique (25). Le fait que le phénotype parkinsonnien ne soit pas perçu chez la souris α -synucléine mutée peut s'expliquer par le fait qu'il est plus difficile à percevoir chez la souris le phénotype parkinsonnien. Une certaine rigidité peut être perçue, mais pas aucun tremblement n'est perceptible. Alors soit que le modèle animal n'a pas été bien choisi pour vérifier le phénotype parkinsonnien ou bien les chercheurs n'ont pas attendu assez longtemps pour vérifier le phénotype parkinsonnien. Il se peut aussi que les dommages striataux sont causés, mais qu'ils ne sont pas encore traduits en problèmes locomoteurs.

1.2.1.2 Gène de la dardarine

Un autre gène identifié pouvant contenir une mutation autosomale-dominante et être impliqué dans la MP héréditaire est LRRK2 (kinase 2 riche en répétition de leucine) (26). Ce gène en temps normal code pour la protéine dardarine. Même si les conséquences de la mutation de ce gène ne sont pas encore connues, on constate qu'il y a une modification dans l'activité protéine kinase de la protéine. Les auteurs qui ont mis en évidence l'implication de ce gène suggèrent que l'altération de cette kinase pourrait entraîner la phosphorylation de l' α -synucléine et de tau, toutes deux impliquées dans la MP et la maladie d'Alzheimer (26).

1.2.1.3 Gène de la parkine

Suite à l'analyse des différents pedigrees de familles atteintes de la MP héréditaire hâtive, on a constaté que le gène le plus couramment affecté par des mutations est celui codant pour la parkine qui se situe sur le chromosome 6q25 (27). La parkine est une ubiquitine ligase responsable de l'ubiquitination de certaines protéines impliquées dans la dégradation protéosomique. Lors d'une mutation autosomale-récessive de la parkine rend non fonctionnel le système d'ubiquitination et la cellule devient ainsi est plus vulnérable au stress (28). Les familles portant des mutations sur le gène de la parkine développent la MP vers l'âge de 30 ans.

1.2.1.4 Gène DJ1

Un gène qui compte plus de 11 mutations autosomales-récessives différentes, ce qui fait de lui le second plus important dans la MP hâtive, se situe sur le gène DJ1 (29, 30). On ne connaît pas encore très bien les fonctions de la protéine DJ-1, mais elle serait impliquée dans la réponse au stress oxydatif. Elle pourrait agir comme antioxydant, puisque en présence d'un agent oxydant on note sa transformation en un dérivé plus oxydé, signe de sa capacité à donner des protons. De plus, DJ-1 pourrait former des complexes ARN-protéine pour induire la transcription de certains gènes impliqués dans

la réponse à un stress. Lors d'une mutation, la protéine perd son activité de défense et la cellule est plus susceptible à l'attaque du stress oxydatif (31).

1.2.1.5 Gène PINK1

PINK1 est un gène situé sur le même chromosome que DJ1 et peut subir deux mutations différentes autosomales-récessives et ainsi être responsable de la MP hâtive. PINK1 code pour la protéine kinase 1 induite par PTEN (32). Cet enzyme se retrouve dans la mitochondrie et semble prévenir une dysfonction de la mitochondrie en cas de stress oxydatif. L'enzyme possède une activité kinase et une mutation pourrait modifier sa réponse au stress.

La figure 1.5 qui suit résume bien les mutations des principaux gènes trouvés à être responsable de la forme héréditaire de la MP.

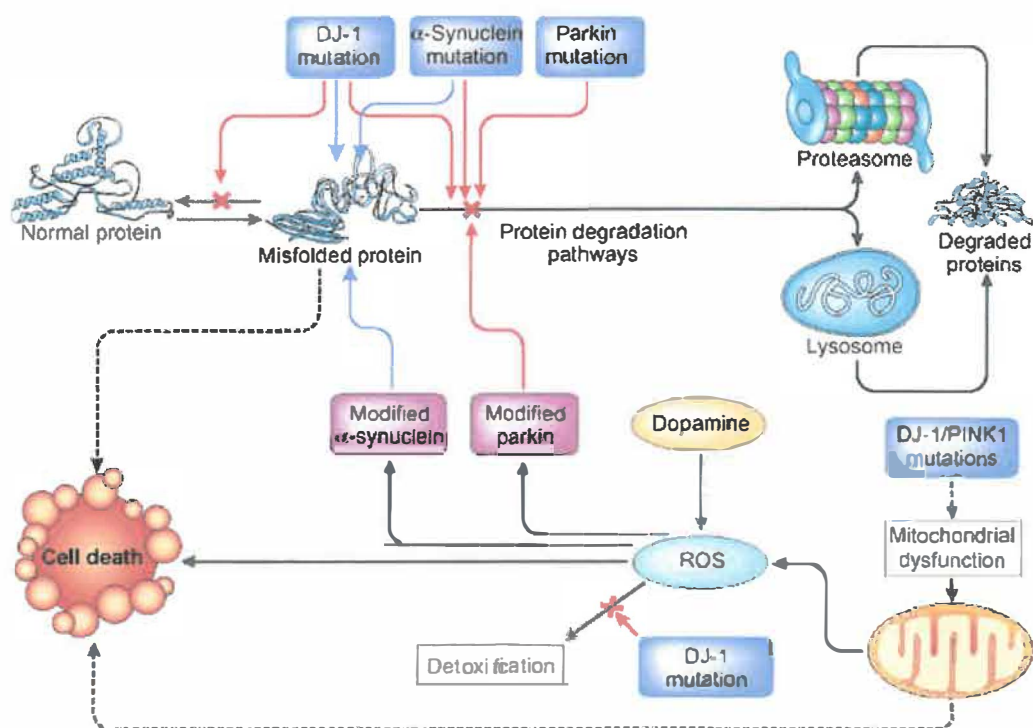


FIGURE 1.5: Résumé des mutations génétiques impliquées dans la MP hâtive (19)

1.2.2 La MP idiopathique

Dans plus de 95% des cas de la MP, il n'y a pas de cause génétique. On fait alors référence à la forme idiopathique de la MP, c'est-à-dire qu'on ne connaît pas réellement la cause de la maladie, mais les toxines environnementales telles que les pesticides/insecticides, la pollution pourraient générer un environnement radicalaire et induire un stress oxydatif sur les neurones du cerveau. Dans la section qui suit, l'implication du stress oxydatif dans la MP sera discutée, puisque jusqu'à ce jour cette théorie demeure l'hypothèse la plus plausible pour expliquer le développement de la maladie.

1.2.2.1 Le stress oxydatif

Qu'est-ce que le stress oxydatif? C'est le résultat du déséquilibre entre la formation de radicaux libres et les défenses antioxydantes du corps. Les radicaux libres sont des molécules très instables, auxquels manque un électron ou plusieurs électrons. Ils sont formés de façon normale dans l'organisme et sont essentiels au bon fonctionnement du métabolisme. Ils peuvent aussi provenir d'une source exogène et lors d'un trop grand apport en radicaux libres externes, il se crée un déséquilibre. Jusqu'à ce jour, plus de 100 maladies peuvent être associées aux méfaits des radicaux libres, dont principalement les maladies neurodégénératives (33). Le cerveau est un des organes les plus susceptibles à l'attaque des radicaux libres. En effet, il possède une activité métabolique plus élevée, une plus forte quantité de gras polyinsaturés, il y a un fort taux d'oxydation neurochimique et d'auto-oxydation de certaines catécholamines, une forte quantité de fer et il possède un taux plus faible d'enzymes détoxificateurs, comme la catalase (Cat), la glutathione peroxydase (GPx) et la superoxyde dismutase (SOD). Tous ces facteurs font en sorte d'accentuer les dommages causés par les radicaux libres et leur implication sera discutée dans les sections à venir.

1.2.2.2 Les radicaux libres endogènes

Les systèmes vivants aérobiques ont besoin d'oxygène pour vivre. Le métabolisme normal transforme environ 95% des molécules d'oxygène en eau. Cependant, près de

5% de l'oxygène total peut être semi-réduit en espèces oxygénées très réactives. En effet, la mitochondrie est le principal producteur de radicaux libres, puisque dans la chaîne de transport des électrons, l'oxygène est l'accepteur final d'électrons. Étant donné qu'il ne peut accepter qu'un seul électron à la fois, il peut se former temporairement des anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$). Lors d'une défectuosité dans le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons, il peut s'accumuler des radicaux libres toxiques dans la cellule. Il s'ensuit par la suite l'initiation d'une série d'oxydations menant au stress oxydatif endogène et la création de dommages cellulaires. Les espèces oxygénées très réactives sont, entre autre, le $O_2^{\cdot-}$ et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), présents de façon ubiquitaire dans les systèmes vivants.

Deux autres sources de radicaux libres endogènes dans le cerveau proviennent de l'auto-oxydation et du métabolisme enzymatique de la DA. En effet, des chercheurs ont vite soupçonné la DA comme une source majeure de radicaux libres dans la SNc lorsqu'ils y ont découvert la présence du pigment neuromélanique, un produit de dégradation de la DA. Lors du métabolisme enzymatique de la DA, il y a une déamination de cette dernière par la monoamine oxydase (MAO) qui forme la dopaminochrome et du H_2O_2 . De plus, le résultat de l'auto-oxydation de la DA génère des semi-quinones ($SQ^{\cdot-}$), $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 , cette réaction peut être catalysée par le fer, présent en forte quantité dans la SNc (34). En plus des effets toxiques directs du $O_2^{\cdot-}$ et du H_2O_2 produits, il a été démontré que les quinones pouvaient induire des dommages protéiques via une attaque nucléophile (35). La figure 1.6 décrit la réaction d'auto-oxydation de la DA.

Le H_2O_2 formé par la dégradation de la DA n'est pas très dommageable pour les cellules sous cette forme. Par contre, par la **réaction de type Fenton**, il y a formation de radicaux hydroxyles ($\cdot OH$) extrêmement réactifs et toxiques pour les cellules. La réaction de Fenton consiste à la réaction entre le H_2O_2 et le fer intrinsèque des cellules. L'équation 1.1 qui suit résume la réaction de type Fenton. Il faut mentionner qu'il y a une grande quantité de fer dans la SNc, accessible pour réagir avec le H_2O_2 (36). Ainsi, il y a une augmentation accrue de la production de radicaux libres dans les cellules nerveuses lors de la réaction entre le H_2O_2 et le fer.

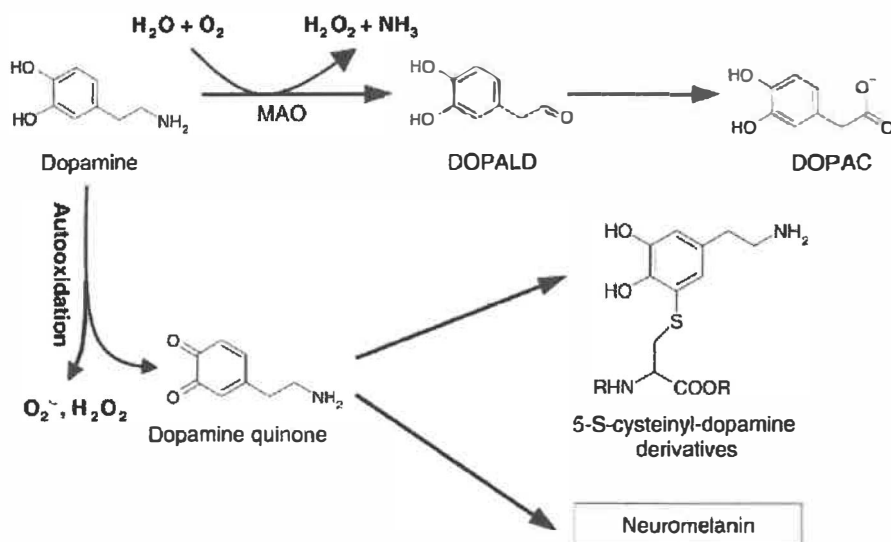
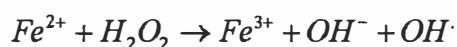


FIGURE 1.6: Métabolisme de la DA par auto-oxydation et par dégradation enzymatique



Réaction de type Fenton

[1.1]

1.2.2.3 Les radicaux libres exogènes

Les radicaux libres exogènes proviennent d'un apport extérieur, c'est-à-dire lors d'une exposition à un environnement toxique. Les xénobiotiques, les pesticides, les insecticides sont seulement quelques exemples de toxines qui peuvent pénétrer au cerveau et induire la formation de radicaux libres.

1.2.2.4 Les cibles du stress oxydatif

Les radicaux libres sont très dommageables pour les cellules puisqu'ils tentent de combler leur électron impair en attaquant les protons sur les molécules biologiques. Ceci a pour effet d'affecter l'intégrité de structure et de fonction de la cellule et cette dernière enclenche le processus de mort cellulaire par apoptose (qui sera discuté à la section

1.2.2.5). Les trois différentes classes de molécules biologiques, soit les lipides, les protéines et l'ADN sont particulièrement affectées par les radicaux libres (37).

Il a été maintes fois démontré dans le cerveau de patients parkinsonniens qu'il y avait un fort taux de peroxydation lipidique (38). En fait, les radicaux libres sont capables de peroxyder les lipides des membranes cellulaires formant des aldéhydes hautement réactifs face aux macromolécules. Le produit de la peroxydation des gras polyinsaturés majoritairement formé est le 4-hydroxynonanal (HNE) (39). En fait, le HNE agit comme un second messager des radicaux libres et produit un effet synergique de cytotoxicité avec ces derniers. Le HNE peut inhiber la synthèse protéique, celle de l'ADN et de l'ARN, il peut aussi interférer avec l'activité de certains enzymes (38). Il a été démontré que le HNE est présent dans les CL et les travaux de ces chercheurs sont venus appuyer le fait que la peroxydation lipidique était augmentée dans le cerveau de patients parkinsonniens, mais aussi que le stress oxydatif pouvait jouer un rôle important dans la formation des CL (40).

Les dommages à l'ADN ne sont pas augmentés dans la MP, mais c'est plutôt l'état d'oxydo-réduction qui est modifié vers un état plus oxydé. En fait, les radicaux hydroxyles, plus que tous les autres radicaux libres, attaquent la guanine de l'ADN et forment du 8-hydroxyguanine et du 8-hydroxy-2-déoxyguanosine. Brièvement, lors de l'attaque des radicaux libres sur la guanine, il se forme un intermédiaire d'où peuvent dériver des produits d'oxydation, tel que le 8-hydroxyguanine ou des produits de réduction, telle que la guanine Fapy (voir la figure 1.7). Dans la MP, il y a une augmentation du taux de 8-hydroxyguanine (41) et une réduction de la guanine Fapy (42), laissant un ADN dans un état plus oxydé que normalement et donc moins stable.

Finalement, l'oxydation des acides aminés par les radicaux libres forme des carbonyles très réactifs. Même si le niveau basal d'oxydation des protéines est élevé en temps normal dans la SNc, le niveau de carbonyle protéique réactif est accru dans la MP. Contrairement à tous les autres marqueurs de stress oxydatif dans la MP, qui sont spécifiquement accrus dans la SNc, le niveau de carbonyle protéique est accru dans

toutes les régions du cerveau dans la MP (43). Mais on ne connaît pas encore ses implications directes dans la MP.

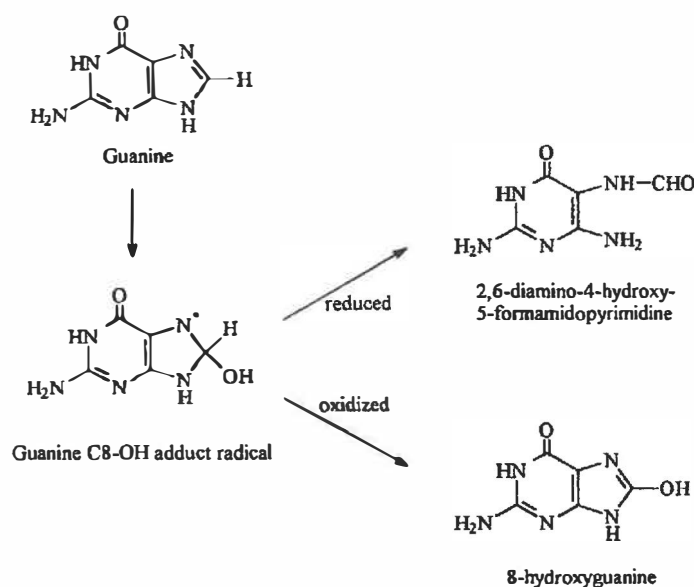


FIGURE 1.7: Attaque de la guanine de l'ADN par le radical hydroxyle (42)

1.2.2.5 Le processus de mort apoptotique : un résultat du stress oxydatif

Les dommages importants causés à l'ADN, les lipides et les protéines par les radicaux libres entraînent l'initiation du processus d'apoptose. C'est un processus de mort cellulaire programmée enclenchée par la cellule lorsqu'elle a perdu son intégrité de structure ou de fonction. Ce phénomène est caractérisé par un rétrécissement de la cellule, une condensation de l'ADN et une altération des membranes mitochondriales qui mènent à la formation de petits corps apoptotiques phagocytés par les macrophages environnants (44). Habituellement, le processus d'apoptose transige par la mitochondrie. En réponse à un stimulus apoptotique, le potentiel transmembranaire mitochondrial est modifié et la mitochondrie devient plus perméable à certains ions (45). À ce moment, il peut y avoir un relâchement de cytochrome C et ce dernier peut lier la pro-caspase-9, la cliver et former la caspase-9 activée. Cette dernière peut alors activer les pro-caspases-3,6,7,8. La caspase-3 est une protéase qui peut avoir comme substrat des protéines nucléaires et du cytosquelette, ce qui mène à la condensation de la cellule (46). De plus,

la caspase-3 peut cliver l'inhibiteur de DNase activé par les caspases (ICAD). Ainsi, il y a formation de CAD activée, une DNase très efficace dans la fragmentation de l'ADN.

Il est démontré que dans la MP, les neurones DAergiques meurent par apoptose, puisqu'ils présentent une fragmentation des noyaux (47) et une augmentation de la quantité de caspase-3 activée est présente dans la SNc de souris traitées au 1-méthyl-4-phényl-1,2,5,6-tétrahydropyridine (MPTP) (46, 48). Même si l'apoptose peut être enclenché par différentes voies, les radicaux libres semblent être les principaux initiateurs dans la MP. La figure 1.8 qui suit représente les étapes finales du processus d'apoptose.

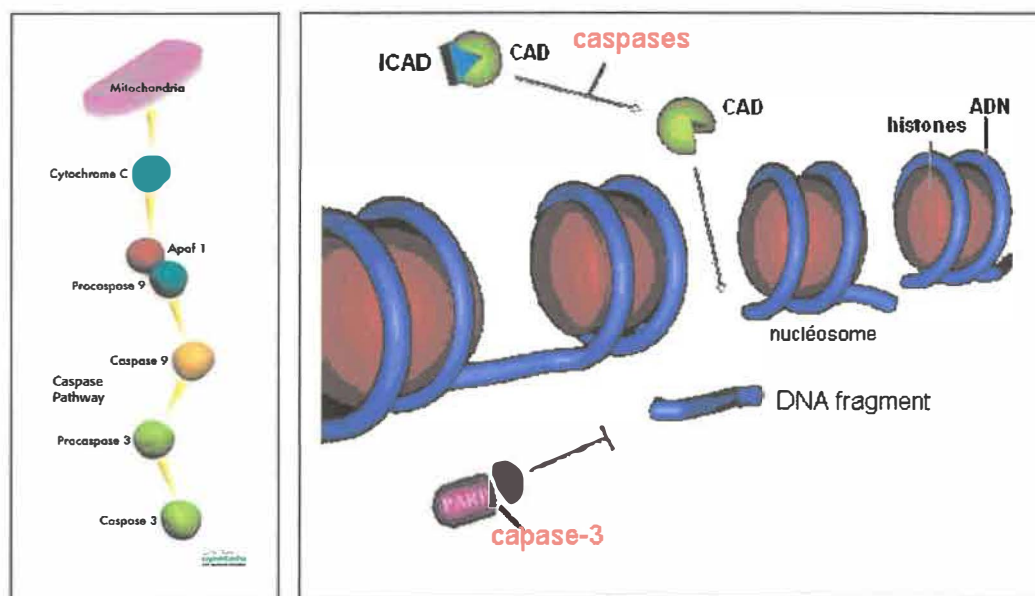
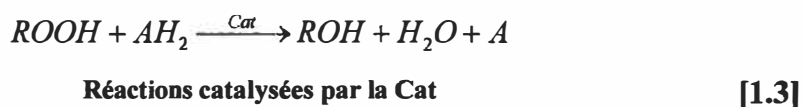
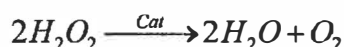
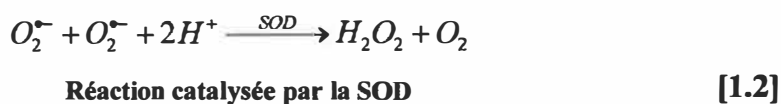


FIGURE 1.8: Étapes finales du processus d'apoptose.
À gauche : Activation de la caspase-3. À droite : fragmentation de l'ADN.

1.2.2.6 Les défenses antioxydantes de la cellule

Le corps humain subit les effets du stress oxydatif tout au long de sa vie. C'est pourquoi il a dû évoluer et se créer une barrière de défense naturelle contre les radicaux libres. Plusieurs molécules, dont quelques enzymes, font parties de cette défense naturelle du corps (49).

Trois enzymes très connus pour leur capacité de détoxification contre les radicaux libres sont la SOD, la GPx et la Cat. La SOD est un enzyme qui catalyse la conversion du $O_2^{\bullet -}$ en espèces moins réactives, le H_2O_2 et en O_2 (équation 1.2). Le H_2O_2 peut être par la suite converti par la Cat en eau et en oxygène (équation 1.3). La Cat peut aussi convertir des peroxydes (ROOH) en eau (équation 1.3). Ainsi, toutes molécules toxiques pour les cellules sont converties en molécules plus stables. La Cat prévient aussi la réaction de type Fenton en réduisant le niveau de H_2O_2 , car dans le cas échéant la réaction entre le H_2O_2 et le fer formerait des radicaux hydroxyles.



La GPx convertit les ROOH en alcool aidée de la glutathione (GSH) (équation 1.4). Le métabolisme de la GSH est un des systèmes de protection le plus essentiel pour la cellule.



De plus, certaines molécules fournies par l'alimentation sont essentielles à la défense antioxydante de la cellule. C'est le cas entre autre de la vitamine C, E et la GSH. En présence de radicaux libres, la vitamine E fait un don de son hydrogène phénolique afin de stabiliser l'électron impair des radicaux libres pour éviter l'effet toxique de ceux-ci. La vitamine E devient donc radicalaire, mais est beaucoup moins réactive. Par la suite, la vitamine C réagit avec la vitamine E radicalaire pour former à son tour de la vitamine C

radicalaire et permettre de régénérer la vitamine E. Tout comme la vitamine E, la vitamine C radicalaire n'est pas réactive puisque son électron impair se trouve dans le cycle phénolique et est énergétiquement stable. La vitamine radicalaire C peut être reconvertie en vitamine C intacte par la GSH. Lorsque la GSH est oxydée (GS^{\bullet}) (lorsqu'elle a transféré un proton aux vitamines) elle peut réagir avec une autre molécule de GSH oxydée et former GS-SG et peut être par la suite être réduite en GSH à nouveau par la glutathion réductase NADPH-dépendante (50). Ainsi, ce cycle impliquant trois molécules alimentaires permet une défense antioxydante des cellules, mais peut aussi se régénérer.

1.2.2.7 Altérations dans la MP favorisant le stress oxydatif

Dans la MP, il est évident que certains systèmes sont défectueux. Les paragraphes qui suivent font une revue des principales altérations biochimiques qui sont dénotées dans la MP.

Altération du contenu en fer dans la MP

Le fer est présent de façon normale dans le corps, mais il est retrouvé en plus forte quantité dans la SNc que dans les autres régions du cerveau (36). Le 2/3 du fer total du corps sert au transport de l'oxygène dans l'hémoglobine. Plusieurs enzymes contiennent aussi du fer, telles que la transferrine et la lactoférine qui transportent le fer dans le corps et celles servant à l'emmagasiner du fer, la ferritine et l'hémosidérine. Les travaux de Ben-Shachar ont démontré que le fer pouvait s'accumuler dans les granules neuromélaniques. Cela peut expliquer le fait que le niveau de fer soit plus élevé dans la SNc, plus précisément dans les neurones DAergiques, qu'ailleurs dans le cerveau (51). La séquestration du fer dans les complexes protéiques permet une défense antioxydante, puisqu'ils réduisent les possibilités d'une réaction de type Fenton avec le H_2O_2 .

Cependant, des études post mortem de patients atteints de la MP, ont démontré que le niveau de fer est significativement augmenté dans la SNc (52, 53). Mais d'où provient cette augmentation en fer dans la MP? En fait, il y a plusieurs hypothèses qui sont avancées. a-) La redistribution du fer se fait de façon courante dans le corps et fait partie intégrante de son métabolisme. Dans la MP, il peut y avoir un changement dans la distribution du fer dans le cerveau qui peut mener à son accumulation dans certaines régions les plus affectées. b-) De plus, il a été démontré que le fer pouvait s'accumuler dans certaines régions du cerveau lorsqu'il y avait une défectuosité du système d'élimination du fer. c-) Certaines protéines impliquées dans l'emmagasiner du fer, telle que la ferritine, peuvent être dégradées, ce qui peut entraîner le relâchement du fer. d-) En réponse aux dommages cellulaires, les cellules microgliales activées (qui sont riches en fer) peuvent s'infiltrer dans les régions endommagées et peuvent être responsables de l'augmentation locale du fer. Dans la MP, il a été observé qu'il y a une forte augmentation de cellules gliales dans la SNc.

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont démontré le pouvoir du fer à induire un stress oxydatif et subséquemment la mort cellulaire (54-56). Quelques équipes ont tenté de reproduire l'augmentation en fer dans la SNc en injectant directement du fer dans la région nigrale dans le cerveau de souris. En plus d'avoir généré un bon modèle de stress oxydatif, ces chercheurs ont obtenus des données histologiques, biochimiques et comportementales associées au parkinsonisme (55).

Altération des fonctions mitochondriales dans la MP

Un défaut dans le métabolisme énergétique mitochondrial a vite été soupçonné comme responsable, ou du moins impliqué, dans la MP avec la découverte du MPTP dans les années 1980 (57). Quelques héroïnomanes de Californie avaient consommé de l'héroïne de synthèse et ils avaient développé quelques jours plus tard des syndromes parkinsoniens. On a découvert par la suite la présence de trace d'un contaminant dans l'héroïne, le MPTP. On sait aujourd'hui que le MPTP est une neurotoxine pouvant traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) et est transformé en MPP⁺, son

métabolite actif (58). La formation du MPP^+ se fait dans les astrocytes par la MAO-B. Le MPP^+ peut alors pénétrer dans les neurones DAergiques par le transporteur de la DA (DAT) (59). L'étude de son mécanisme d'action a permis de découvrir que le MPP^+ a la capacité d'inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire, d'induire une défaillance dans la production d'ATP et de générer des radicaux libres (57, 60, 61). Le MPP^+ peut aussi inhiber un enzyme mitochondrial qui ne fait pas parti de la chaîne respiratoire, l' α -kétoglutarate déshydrogénase (α -KGDH) (62). L'étude de la toxicité du MPTP a permis par la suite de mieux comprendre certains phénomènes associés à la MP.

Schapira (63) et Mizuno (64) furent les premiers à démontrer une diminution de l'activité du complexe I dans la SNc de cerveaux provenant de patients atteints de la MP (65). Plus tard, lors de marquages immuno-histochimiques, cette réduction de l'activité du complexe I s'est précisée dans les neurones DAergiques spécifiquement (66). Mais il n'en demeure pas moins qu'il est difficile de croire qu'une diminution de 30% de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire des neurones DAergiques (qui représentent seulement 2% des neurones de la SNc) puisse altérer ainsi le métabolisme énergétique.

Les chercheurs ont par la suite démontré qu'il y avait aussi l'inhibition de l' α -KGDH (67). Probablement que l'effet synergique de l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire et de l' α -KGDH pourraient être responsable de l'altération des fonctions mitochondriales menant au stress oxydatif dans les cellules.

De fortes évidences supportent qu'une mutation de l'ADN mitochondriale codant pour le complexe I pourrait expliquer la sensibilité du complexe I à certains agents neurotoxiques (68). La figure 1.9 montre la bioconversion du MPTP en MPP^+ et la figure 1.10 schématise les modes d'action du MPP^+ .

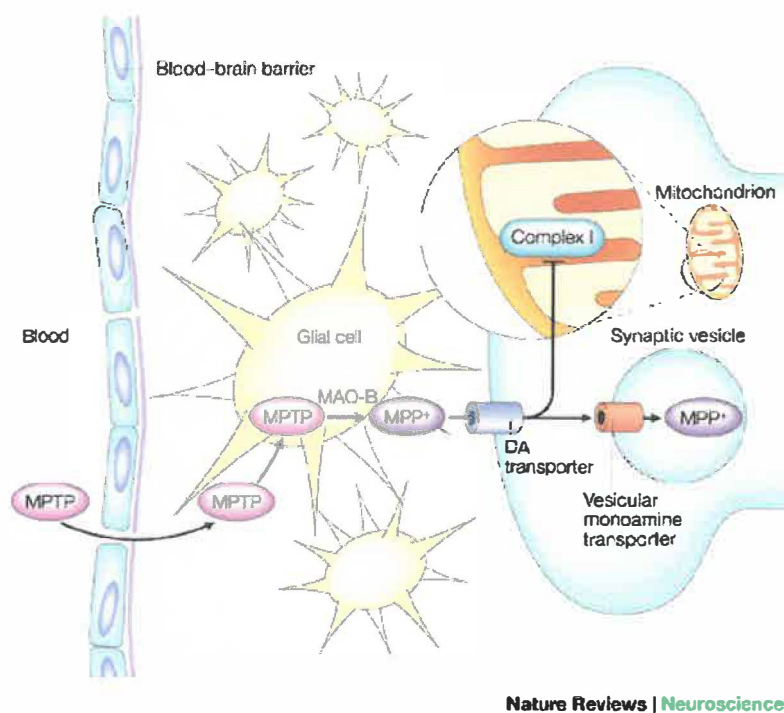


FIGURE 1.9: Transformation du MPTP en MPP⁺ par la MAO-B des astrocytes

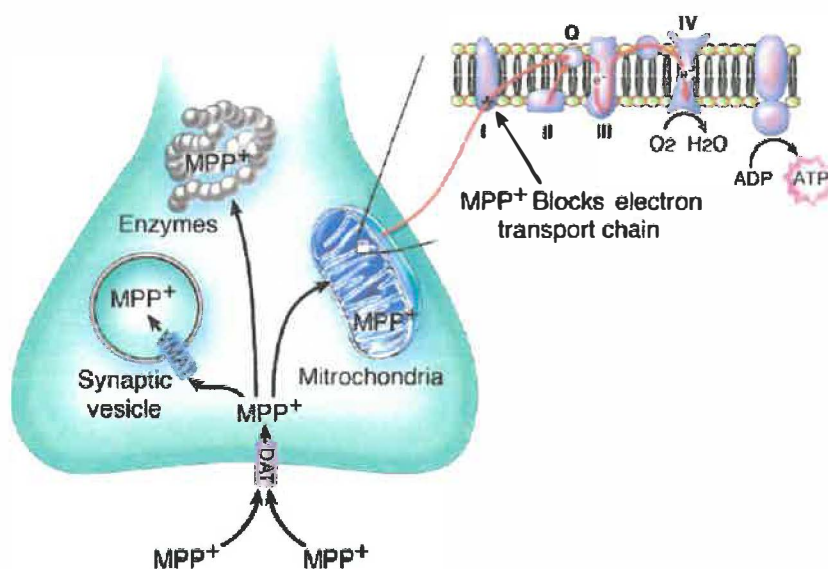


FIGURE 1.10: Mécanisme d'action du MPP⁺ (13)

Altération des enzymes antioxydants dans la MP

Tel que décrit précédemment, les enzymes antioxydants sont responsables de la détoxification des radicaux libres dans les cellules. Le niveau de chacun de ces enzymes a été étudié dans le cerveau de patients atteints de la MP. Le niveau de Cat est réduit de 30 à 50% dans la MP comparativement à des sujets contrôles de même âge. Tel qu'attendu, la surexpression de Cat rend les sujets plus résistants contre la toxicité du H_2O_2 (69). L'équipe de Ho a créé une lignée de souris qui n'exprime pas de Cat fonctionnelle. La souris se développe normalement, mais les chercheurs ont démontré que les mitochondries sont plus sensibles à l'attaque d'oxydants (70).

De plus, des souris sur-exprimant la SOD ou GPx ont été exposées pendant 9 semaines au paraquat (un pesticide chimiquement similaire au MPTP) tout comme des souris normales. Les souris normales démontraient une diminution de l'activité motrice, une réduction du niveau de DA striatal de même qu'une augmentation du taux de peroxydation lipidique dans la SNc. En contraste, aucune de ces observations ne furent relevées sur les souris transgéniques SOD et GPx^(+/+) (71).

Des études ont aussi démontré que le niveau de SOD cytosolique (Cu/Zn SOD) est diminué chez des souris traitées au MPTP (72) de même que chez des patients atteints de la MP (73).

Altération du contenu en GSH dans la MP

Différentes régions de la SNc de cerveaux parkinsoniens ont été étudiées pour leur niveau en GSH et GSH oxydée. La GSH était diminuée de 40% dans le cerveau de patients atteints de la MP comparativement au cerveau sain et le niveau de GSH oxydée était augmentée par rapport au contrôle. Donc la diminution de cette molécule antioxydante très essentielle rend le cerveau plus sensible à l'attaque des radicaux libres (74, 75).

Augmentation du turnover de la DA dans la MP

On a vu précédemment qu'il y avait plusieurs modifications physiologiques dans la MP qui conduisent au stress oxydatif. Mais ces modifications, surtout celle en fer et en GPx, peuvent aussi mener à une augmentation du turnover (métabolisme) de la DA. En effet, la figure 1.11 qui suit démontre les conséquences d'une diminution en GPx et une augmentation en fer retrouvées dans la MP.

En temps normal (voie en noir), le métabolisme de la DA produit des O_2^- et du H_2O_2 qui sont éliminés par la SOD et la GPx. Dans la MP (voir rouge), il y a une diminution de GPx (75) et une augmentation en fer (52, 53) et par conséquent, il y a une augmentation de formation de radical hydroxyle toxique pour les cellules et il se crée un déséquilibre.

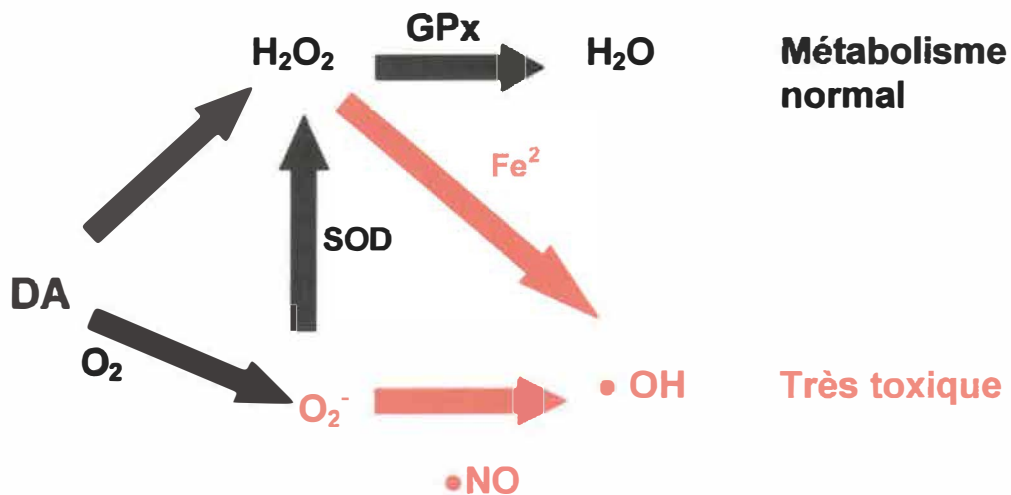


FIGURE 1.11: Augmentation du turnover de la DA dans la MP

La figure 1.12 qui suit fait un résumé des diverses sources de radicaux libres qui peuvent affecter les cellules, de même que les principales défenses antioxydantes de la cellule.

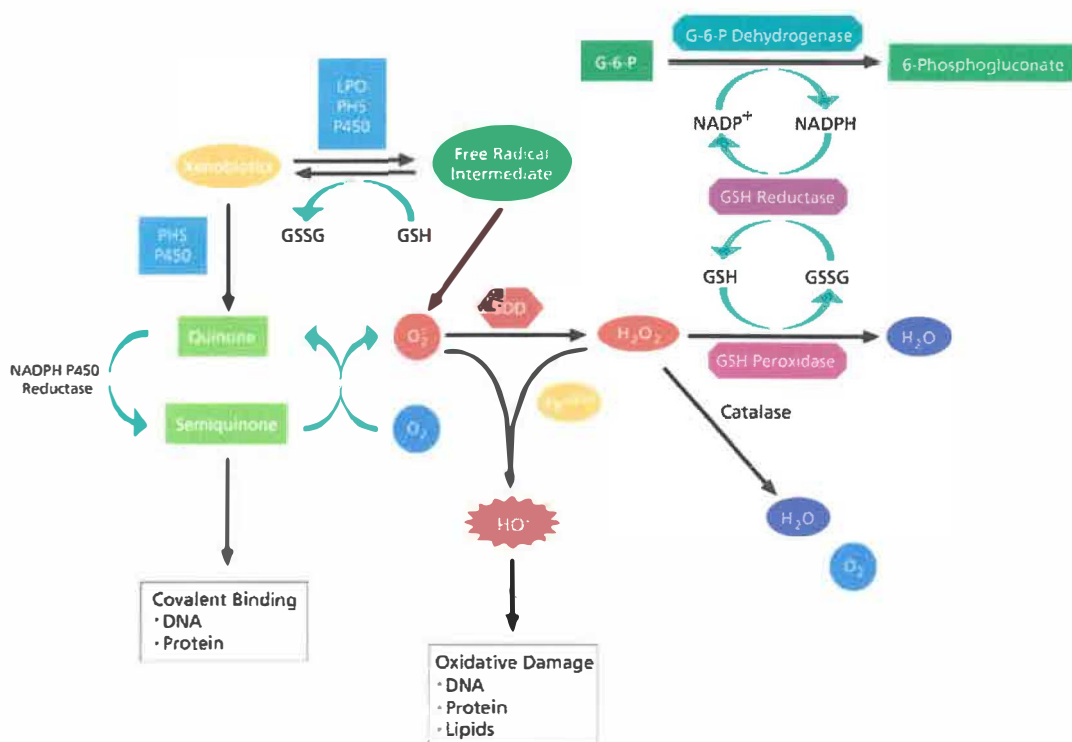


FIGURE 1.12: Résumé des sources de radicaux libres et des défenses antioxydantes de la cellule

1.2.3 Le rôle de l'inflammation dans la MP

Comme il a été discuté dans les paragraphes précédents, le mécanisme par lequel il y a dégénérescence des neurones DAergiques dans la MP demeure encore un sujet de débat. Plusieurs évidences appuient le fait que des modifications cellulaires et métaboliques par le stress oxydatif mènent à la mort neuronale. Mais, depuis une dizaine d'années, on a reconnu que l'inflammation dans le cerveau (neuroinflammation) pouvait jouer un rôle important dans le déclenchement, ou du moins dans la progression de la MP (76). Même si la neuroinflammation et le stress oxydatif semblent deux sujets très distincts, ils sont pourtant intimement reliés dans la MP (77). En effet, comme il sera décrit dans la section qui suit, au cours du processus de neuroinflammation, diverses cytokines et radicaux libres sont produits et peuvent causer la mort neuronale par apoptose. En effet, les radicaux libres produits par la microglie activée peuvent augmenter l'état de stress

oxydatif et causer l'apoptose des cellules neuronales. Les cytokines enclenchent aussi la mort neuronale via le processus de mort apoptotique, puisqu'ils lient les récepteurs de mort cellulaire ou « *death receptor* ».

L'activation de la microglie peut être induite par certains agents infectieux, par exemple *Helicobacter pylori*, certains agents neurotoxiques (MPTP) ou même des dommages neuronaux de types ischémiques (78). En fait, cette activation de la microglie demeure très controversée, certains croient qu'elle peut jouer un rôle bénéfique, alors que d'autres croient que l'activation microgliale peut amplifier les dommages neuronaux dans la MP. La section qui suit discutera principalement des différentes lignes de pensée quant aux processus inflammatoires et de leur implication, puis il y aura une revue des principaux modèles utilisés pour l'étude de l'inflammation dans la MP, mais d'abord voyons un peu le système immunitaire du cerveau.

1.2.3.1 Le système immunitaire du cerveau

La neuroinflammation implique deux types de cellules gliales du cerveau : la microglie et les astrocytes. La microglie est dérivée de cellules mésodermes qui migrent vers le système nerveux central au cours du développement embryonnaire et est un résident permanent du système immunitaire du cerveau mature (79). En fait, son principal rôle se situe au stade embryonnaire. Au cours du développement du fœtus, plusieurs milliers de neurones sont formés. À la fin du développement du système nerveux, le surplus de neurones formés doit être éliminé par la microglie (79). Dans un cerveau adulte, la microglie est la première défense immunitaire du cerveau. Sa morphologie normalement ramifiée devient plutôt ronde en présence d'un stimulus. De plus, elle se divise plus rapidement et plusieurs récepteurs de surface sont exprimés, dont les complexes majeurs d'histocompatibilité, de classe I et II (80).

Enfin, la microglie activée relâche dans son environnement plusieurs facteurs pro-inflammatoires et cytotoxiques.

Les astrocytes, quant à eux, sont responsables en temps normal de l'échange électrolytique entre les neurones et la glie nécessaire aux neurones pour maintenir un bon équilibre homéostatique (81). Lorsque activés par un agents infectieux ou par des dommages au cerveau, les astrocytes augmentent l'expression de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) (82). De plus, ils peuvent sécréter certains facteurs trophiques et des cytokines inflammatoires (78).

En terme de relâchement de facteurs pro-inflammatoires, la microglie diffère grandement des astrocytes (78). En fait, les facteurs relâchés par la microglie active sont beaucoup plus nombreux et complexes que ceux des astrocytes. Le « tumor necrosis factor- α » (TNF- α) semble être sécrété seulement par la microglie lorsqu'elle est stimulée. Les astrocytes ne produisent pas non plus de O_2^- , contrairement à la microglie. De plus, les facteurs produits par les deux types de cellules gliales sont sécrétés généralement en plus grande quantité et plus rapidement par la microglie comparativement aux astrocytes. En effet, la quantité de d'oxyde nitrique (NO) et d'interleukine-1 α et β (IL-1 α/β) sécrétés sont nettement plus sécrétés par la microglie que par les astrocytes. La microglie répond aussi plus rapidement à un stimulus étranger que les astrocytes. Effectivement, suite à une stimulation par le lipopolysaccharide (LPS), une endotoxine bactérienne, la microglie sécrète ses facteurs pro-inflammatoires dans les premiers 6 à 12 heures, contrairement aux astrocytes qui répondent en plus de 24 heures (78).

L'activation de la microglie est aussi associée à une augmentation de l'expression de deux enzymes importants dans l'inflammation : la synthase d'oxyde nitrique inducible (iNOS) et la cyclooxygénase (COX-2), responsables respectivement de la production de NO et de prostaglandines E2 (PGE2) (83, 84). De toute évidence, la microglie est la première ligne de défense contre un agent infectieux ou des agents neurotoxiques.

La figure 1.13 qui suit illustre la production des différents facteurs pro-inflammatoires selon les deux types de cellules et dans le temps.

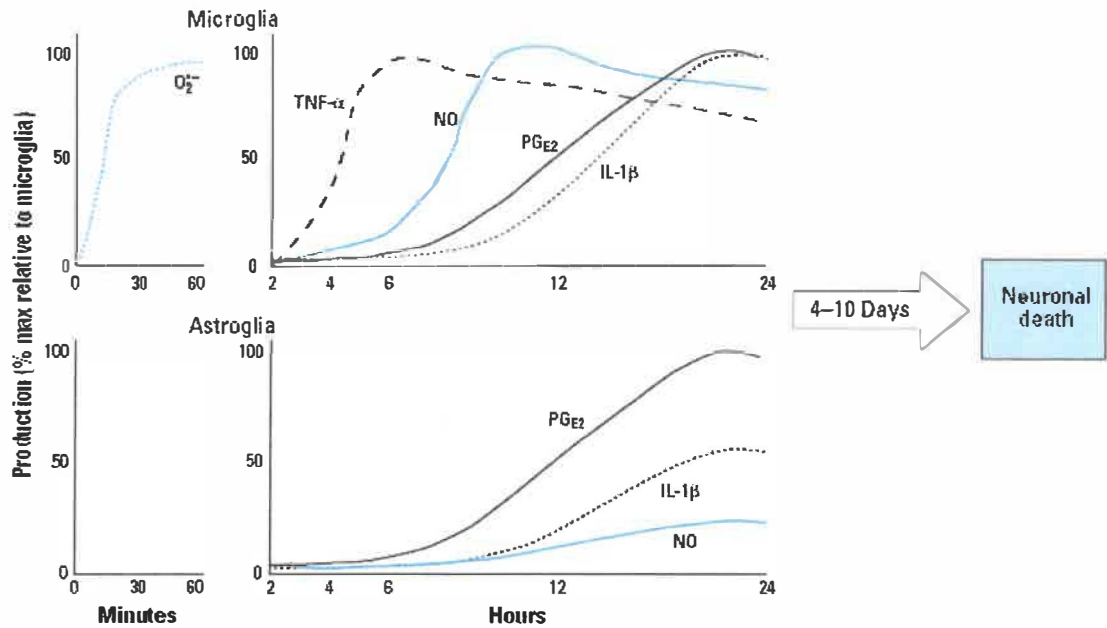


FIGURE 1.13: Production des différents facteurs pro-inflammatoires par la microglie et les astrocytes (78).

1.2.3.2 Mécanismes de neurotoxicité des cytokines pro-inflammatoires

Comme il a été décrit dans la dernière section, les cytokines pro-inflammatoires sont capables de causer la mort neuronale. Leur production par les cellules gliales est très rapide et est requise pour initier le processus inflammatoire et pour le recrutement des autres cellules immunitaires. L'IL-1 et le TNF- α peuvent agir de deux façons pour initier le processus inflammatoire et causer la mort neuronale. La première est une voie indirecte à laquelle le TNF- α et l'IL-1 peuvent induire la production de NO dans les cellules gliales (85). En fait, le TNF- α et l'IL-1 peuvent lier un récepteur de faible affinité pour l'immunoglobuline E (CD23). L'activation de ce récepteur peut activer l'iNOS, d'un mécanisme encore inconnu, et induire la production de NO. Le NO peut diffuser jusqu'aux neurones DAergiques et réagir avec le $O_2^{\cdot-}$ et former du $ONOO^{\cdot-}$, qui peut causer entre autre la peroxydation lipidique et la mort des neurones.

Le TNF- α et l'IL-1 peuvent aussi agir de façon directe sur les neurones DAergiques. Une fois sécrétés par les cellules gliales, le TNF- α et l'IL-1 peuvent se lier à leurs

récepteurs spécifiques présents à la surface des neurones DAergiques. Le $\text{TNF-}\alpha$ peut lier le récepteur de $\text{TNF-}\alpha$ de type 1 (TNFR1) et 2 (TNFR2). Cependant, seulement le TNFR1 est impliqué dans la réponse inflammatoire. Une fois TNFR1 activé, plusieurs molécules (TRADD, RIP, TRAF2) peuvent s'y lier et induire la suite de la cascade. Pendant ce temps, IL-1 se lie, lui aussi, à son récepteur IL1R, auquel peuvent se lier aussi plusieurs molécules (ACP, IRAK, TRAF6). Ces deux groupes peuvent par la suite induire conjointement la phosphorylation de l'inhibiteur de NF- κ B (I κ B) (86, 87). Une fois libéré de son inhibiteur, NF- κ B (sous-unités p65 et p50) subit une translocation vers le noyau (figure 1.14).

NF- κ B est un facteur de transcription qui est impliqué dans la réponse à divers stimuli, comme la réponse inflammatoire, la survie cellulaire, l'adhésion cellulaire, la différenciation et la croissance cellulaire. Suite à un stimulus inflammatoire, NF- κ B peut initier l'activation de la transcription de différents gènes pro-inflammatoires, comme COX-2 et iNOS.

COX-2 et iNOS sont deux enzymes qui ne sont pas produits de façon basale, mais leur production est rapidement enclenchée lors d'une réaction inflammatoire. COX-2 est responsable de la production de PGE₂, alors que iNOS produit la NO[•], deux produits impliqués dans l'initiation de l'apoptose des neurones DAergiques (87).

La figure 1.15 résume les mécanismes de neurotoxicité des cytokines inflammatoires.

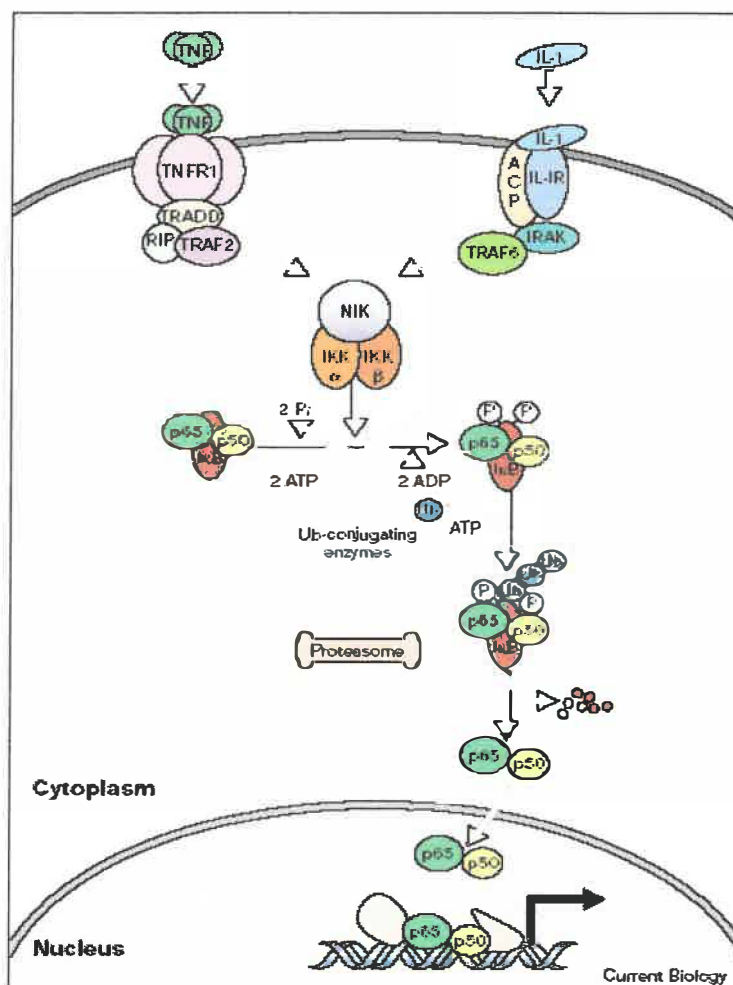


FIGURE 1.14: Processus d'activation de NF-κB (les sous-unités p65 et p50) (86)

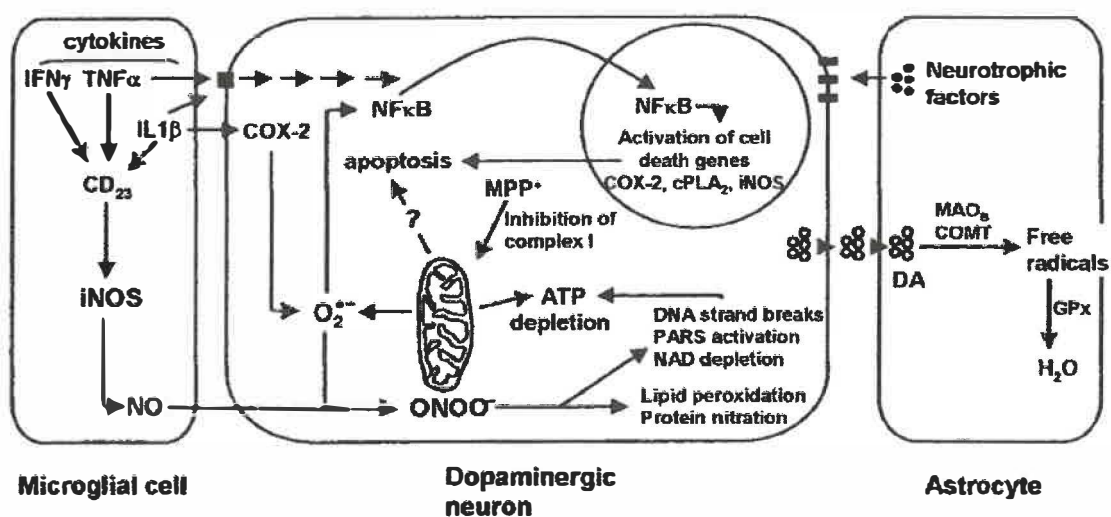


FIGURE 1.15: Modes d'action de TNF-α et d'IL-1 dans la dégénérescence des neurones DAergiques (87).

1.2.3.3 Rôle protecteur des cellules gliales dans la MP

Il est important de mentionner que les cellules gliales et la réaction inflammatoire peuvent avoir un rôle bénéfique dans la protection des neurones et peuvent atténuer la dégénérescence des neurones. En effet, parmi les divers mécanismes de protection, la glie produit des facteurs trophiques qui aident à prévenir la dégénérescence des neurones et peut aussi capter directement des facteurs toxiques relâchés par les neurones en apoptose (87).

Les cellules gliales produisent une grande variété de facteurs trophiques qui aident la survie des neurones DAergiques. Parmi ceux-ci, on compte le facteur neurotrophique dérivé de la glie (GDNF) relâché par la microglie activée. Le GDNF est reconnu pour favoriser l'arborisation des fibres nerveuses DAergiques lors d'une insulte au striatum chez le rongeur (88). De plus, un apport supplémentaire en GDNF chez la souris et le singe atténue significativement les dommages neuronaux induits par le MPTP (89). Le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) est un autre facteur relâché par la microglie activée qui favorise aussi la survie neuronale et l'arborisation des fibres DAergiques de striatums endommagés chez le rongeur (88).

Lors de la mort apoptotique, les neurones DAergiques relâchent des facteurs toxiques qui peuvent activer, en retour, la microglie et enclencher une amplification de la réponse. Les cellules microgliales sont capable de neutraliser directement ces facteurs de rétroaction et donc diminuer la mort neuronale. Les cellules microgliales peuvent aussi prévenir la mort des neurones restants en métabolisant la DA via la MAO-B et la cathécol-O-méthyltransférase des astrocytes, bloquant ainsi l'auto-oxydation de la DA, la formation de radicaux libres et le niveau de stress oxydatif, tel que décrit dans la section 1.2.2.2 (90). De plus, les cellules gliales peuvent contribuer à la détoxification des radicaux libres à l'aide de la GPx, qui est détectée presque uniquement dans les cellules gliales (90).

Dans l'ensemble, les cellules gliales peuvent avoir un effet bénéfique contre la dégénérescence des neurones DAergiques. Ceci est vrai surtout dans le cas d'une insulte légère. Cependant, lors de dommages aigus ou chroniques, les cellules gliales ne peuvent pas compenser pour tous les dommages subis et donc le phénomène de neuroinflammation apparaît comme un ennemi qui ne fait qu'augmenter gravement la perte neuronale.

1.2.3.4 Implication de la neuroinflammation dans la MP

L'étude de l'implication néfaste des cellules gliales dans la MP a connu ses débuts vers 1988 avec les premières publications de McGeer qui dénotait une forte présence de microglie dans le cerveau de patients parkinsoniens, plus particulièrement dans la zone de dégénérescence des neurones DAergiques de la SNc (91). Depuis, plusieurs études ont démontré, suite à l'étude post mortem de cerveaux parkinsoniens, une forte accumulation de certains facteurs pro-inflammatoires dans la SNc, tels que l'IL-1 (92, 93), le TNF- α (94), la iNOS (83) et la production de radicaux libres. Une autre évidence qui appuie l'implication de l'inflammation dans la MP est que des patients traités au anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAID) de façon chronique diminuent vraisemblablement leur risque de développer la MP (95). Enfin, un modèle de souris n'exprimant pas COX-2 s'est avéré plus résistante au MPTP, puisque la réponse inflammation est diminuée (96). Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que la mort des neurones était étroitement liée à la production et l'accumulation de facteurs pro-inflammatoires, tels que IL-1 β (97), TNF- α (98), NO (99) et de O₂⁻ (100).

Cependant, il n'y a aucune preuve directe que l'inflammation est la cause de la MP. On sait seulement que dans la MP, le processus inflammatoire peut aggraver la dégénérescence des neurones DAergiques. Où est la distinction? En fait, il pourrait y avoir un premier phénomène, qui cause la mort primaire des neurones DAergiques et lorsque ces derniers meurent, ils sécrètent certains facteurs capables de recruter la microglie et de l'activer par le fait même. Parmi les facteurs relâchés par les neurones, on peut compter les métalloprotéinases, plus particulièrement la métalloprotéinase-3

(MMP-3). Une récente étude suggère que la MMP-3 est relâchée des neurones en apoptose et peut activer la microglie (101). Une fois activée, la microglie enclenche le processus inflammatoire et relâche dans son environnement des facteurs pro-inflammatoires qui sont capables de détruire les neurones à leur tour, tel qu'il a été décrit précédemment. Ainsi, une fois le cercle vicieux enclenché, il peut être difficile de le désamorcer. La figure 1.16 qui suit résume bien la boucle d'amplification entre la mort neuronale et le processus inflammatoire impliqués dans la progression de la MP.

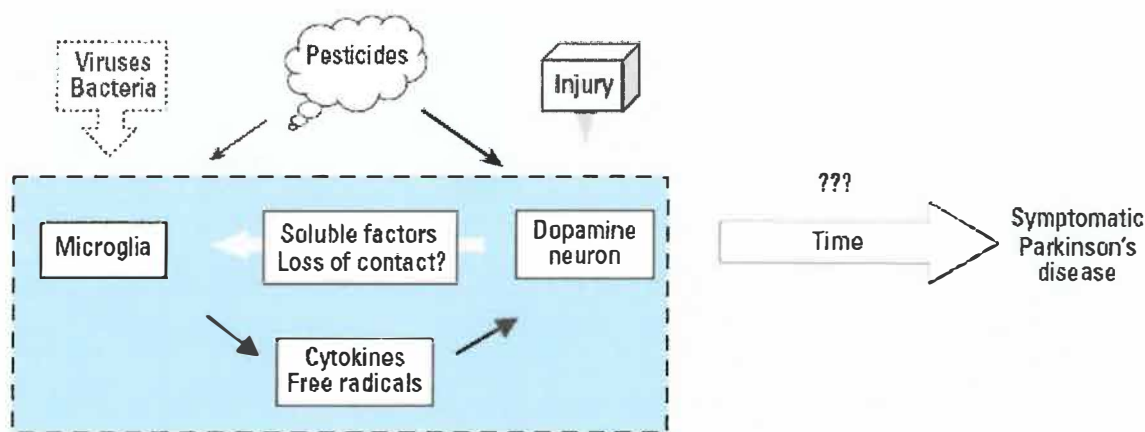


FIGURE 1.16: Boucle d'amplification de la mort neuronale dans la MP via le processus inflammatoire (78).

1.2.3.5 Modèles pour l'étude de l'inflammation dans la MP

Afin d'étudier l'hypothèse que l'inflammation dans le cerveau peut causer la mort neuronale, plusieurs modèles de culture cellulaire et d'animaux ont été développés. Certaines toxines, dont le LPS, sont incapables de détruire directement les neurones, mais induisent la mort neuronale par le biais de l'activation de la microglie (102). Cependant, certains composés, comme le MPTP, sont capables de détruire directement et spécifiquement les neurones, ce qui entraîne l'activation subséquente de la microglie. Finalement, une autre classe de composés, formée entre autre de la roténone, a un mode d'action dit « mixte », puisque en présence de culture neuronale pure, ils peuvent avoir un effet neurotoxique et en plus ils sont capables d'activer directement la microglie. La figure 1.17 qui suit fait un résumé des différentes toxines utilisées pour étudier le

phénomène de neuroinflammation sur des cellules en culture ou sur des modèles animaux.

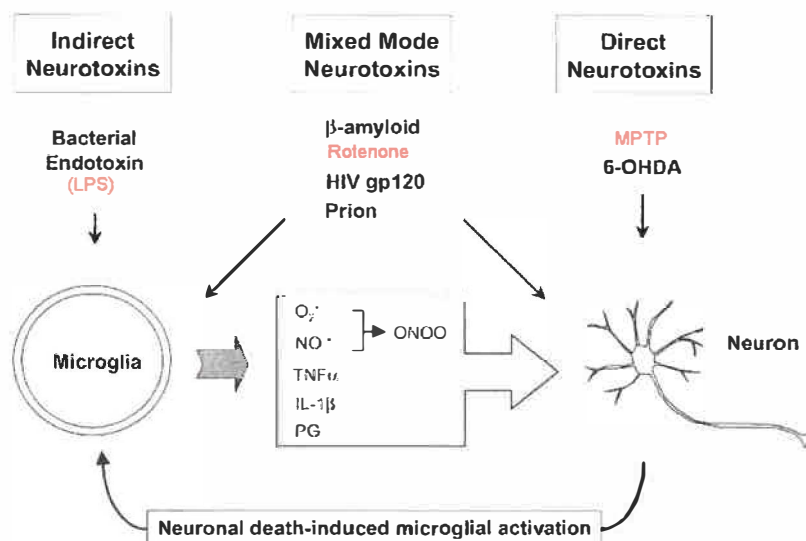


FIGURE 1.17: Différents modèles pour l'étude de la neurotoxicité selon leur mode d'action.
Action indirecte (LPS), directe (MPTP) et mixte (roténone) (103).

Modèles *in vitro* et *in vivo* d'inflammation induite par le LPS

Le LPS est une endotoxine bactérienne produite naturellement, entre autre par *Escherichia coli*. Son rôle en temps normal chez la bactérie est d'assurer l'intégrité de la structure membranaire et de protéger les membranes contre certaines attaques chimiques. Le LPS est cependant la molécule à la surface des cellules qui permet à l'hôte de reconnaître la présence du pathogène et déclencher une réponse immunitaire. Chez le sujet infecté, le LPS peut agir comme endotoxine et induire le phénomène d'inflammation. Dans la circulation sanguine de l'hôte, le LPS se couple d'abord à une protéine liant les lipopolysaccharides pour être ensuite transféré au récepteur CD₁₄/TLR-4 à la surface des cellules immunitaires de l'hôte (104). Le transfert sur ce récepteur active une réponse inflammatoire qui se traduit par une induction rapide de la transcription de NF-κB (figure 1.18). Par la suite, ce facteur nucléaire active très rapidement la transcription de cytokines inflammatoires.

Pour ainsi dire, le LPS n'a pas d'effet neurotoxique directement sur les neurones, mais il induit le relâchement de cytokines par la microglie qui peut causer la mort neuronale (voir la figure 1.18). En effet, en présence de culture neuronale pure, le LPS ne démontre pas de cytotoxicité (102). Cependant, en présence d'une culture mixte de neurones-microglie, il est possible de dénoter une forte mortalité neuronale (102). Une simple injection de LPS intrastriale chez le rat cause aussi une perte importante et irréversible des neurones DAergiques de la SNc (105). Plusieurs études s'entendent pour dire que le LPS est un des meilleurs modèles pour reproduire *in vitro* et *in vivo* la neuroinflammation puisque, suite à l'administration de LPS, une forte activation de la microglie est remarquée, de même qu'une augmentation de la production d'IL-1 (106)

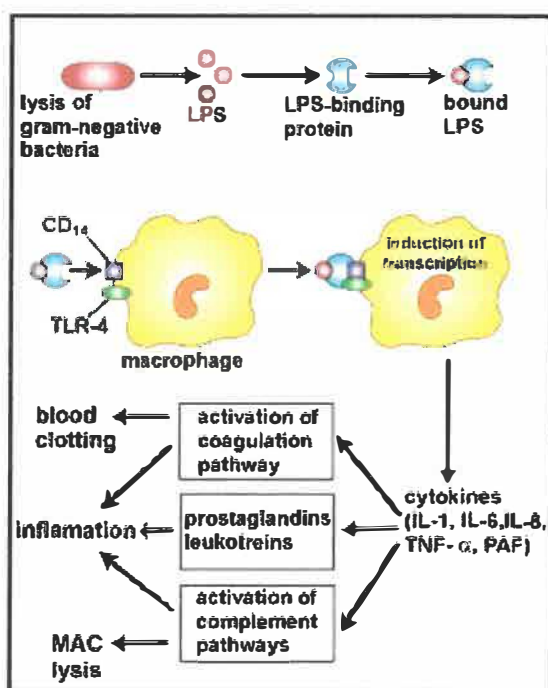


FIGURE 1.18 : Mode d'action du LPS.

Modèle *in vivo* d'inflammation induite par le MPTP

Comme il a été mentionné plus tôt dans la section 1.2.2.7, le MPTP est une neurotoxine qui détruit spécifiquement les neurones DAergiques du cerveau, puisque son métabolite actif, le MPP⁺ a une grande affinité pour le DAT. Il a été très bien documenté, par le passé, que l'activation de la microglie était impliquée dans le modèle MPTP de la MP

(107, 108). L'administration de MPTP est associée à une hausse de la production de IL-1 β (109) et d'IL-6 (107). De plus, suite à l'administration intrastriatale du MPP⁺, il est possible de détecter une activation de la microglie après 2 jours et cette activation est nettement augmentée dans les 3 à 7 jours suivants (110). Ces dernières observations suggèrent alors que le MPTP cause la mort des neurones, qui relâchent alors des facteurs toxiques capables d'activer la microglie.

Modèles *in vitro* et *in vivo* d'inflammation induite par la roténone

On sait que la roténone, un insecticide dont l'usage est aboli depuis quelques années, est un très bon inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire, tout comme le MPP⁺. Il est capable d'induire la mort des neurones DAergiques en culture et *in vivo* (111). Cependant, une nouvelle hypothèse est de plus en plus appuyée dans la littérature. La présence de microglie augmente la neurotoxicité de la roténone. En fait, la roténone serait aussi capable d'activer la microglie directement, ce qui augmenterait davantage la mort neuronale (112).

1.3 Les thérapies de la MP

La section suivante fera une brève revue des thérapies actuelles de la MP. On compte parmi celles-ci, la chirurgie, la médication et la thérapie préventive.

1.3.1 Les traitements chirurgicaux de la MP

Les traitements chirurgicaux ont été vraisemblablement les premiers traitements qui furent étudiés et utilisés pour vaincre les symptômes de la MP.

1.3.1.1 La pallidotomie et la thalamotomie

On s'est très vite rendu compte qu'une personne atteinte de la MP qui faisait une attaque ischémique (manque d'oxygène au cerveau), voyait très souvent une réduction de symptômes associés à la MP. C'est alors que des chercheurs ont fait le lien qu'une lésion

dans le circuit de la voie motrice améliore les symptômes de la MP. Après plusieurs études qui ont tenté de trouver une cible précise, c'est dans les années 1960 qu'on a découvert que l'ablation d'une partie du globus pallidus ou du noyau ventro-latéral du thalamus permettait de supprimer presque complètement les symptômes de la MP (113, 114). Par la suite, on a découvert que dans la MP, il y avait une hyperactivité du globus pallidus et du noyau subthalamique (115). Cette suractivation envoie trop de signaux inhibiteurs au cortex moteur générant ainsi les symptômes de la maladie. Depuis ce moment, la thalamotomie et la pallidotomie ont connu un regain d'intérêt qui s'était dissipé par l'apparition de la dopathérapie. Ainsi, l'ablation du globus pallidus ou du thalamus permet d'inhiber ces signaux inhibiteurs et de pouvoir retrouver les fonctionnalités locomotrices (voir la figure 1.19).

La thalamotomie permet de réduire les tremblements chez plus de 85% des patients, mais n'améliore pas la bradykinésie et l'akinésie (116). Cependant, la pratique de la thalamotomie bilatérale a souvent pour conséquence de causer des déficiences cognitives et linguistiques.

Les meilleurs candidats pour la pallidotomie sont les parkinsoniens héli-latéraux, c'est-à-dire que leurs symptômes sont concentrés à une moitié du corps. En effet, la pratique d'une pallidotomie bilatérale cause souvent plusieurs troubles de langage, de vision et de faiblesses locomotrices. La pallidotomie permet d'améliorer quelques symptômes de la MP, comme les dyskinésies et les tremblements, mais certains comme la rigidité musculaire ne sont pas améliorés avec cette chirurgie.

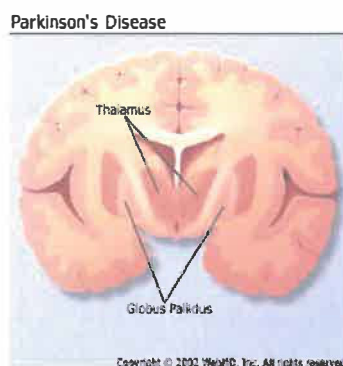


FIGURE 1.19: Chirurgies pour le traitement de la MP.
Ablation du globus pallidus ou du thalamus.

1.3.1.2 Stimulation cérébrale profonde (SCP)

Tous les effets secondaires encourus suite à la pallidotomie et à la thalamotomie ont fait que les chercheurs ont continué à investiguer d'autres possibilités afin de bloquer l'hyperactivation du globus pallidus et du thalamus dans la MP. En 1987, un chercheur de Grenoble avait enregistré la stimulation électrique des neurones, au cours d'une intervention. Il avait constaté qu'une stimulation électrique permettait de modifier les tremblements du patient. À basse fréquence, la stimulation aggravait les tremblements, tandis qu'une stimulation à haute fréquence permettait de diminuer l'amplitude des tremblements (117). Ainsi, on s'est penché sur la question d'une stimulation haute fréquence prolongée des neurones.

La SCP est une chirurgie qui consiste à l'implantation d'un pacemaker qui émet des stimulations électriques à une électrode implantée dans une zone précise du thalamus (voir la figure 1.20). Ces stimulations inhibent l'hyperactivation du globus pallidus oiu du thalamus dans la MP et reproduisent une lésion faite au thalamus comme pour la thalamotomie, mais les risques associés à la chirurgie sont minimes. La SCP se fait surtout chez les patients très handicapés par les tremblements ou par les déficits moteurs associés à la MP. L'avantage de cette implantation est qu'il est possible d'ajuster la fréquence de stimulation électrique avec la progression de la maladie.

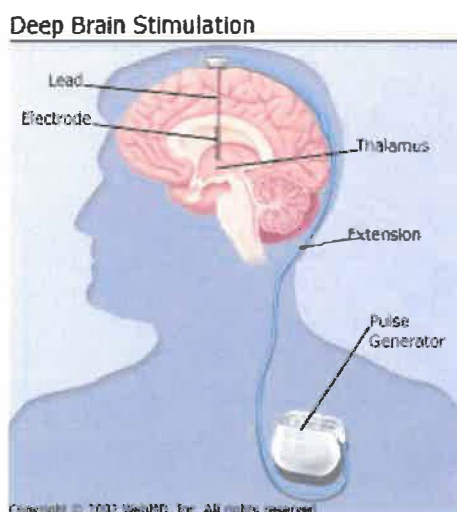


FIGURE 1.20: Schéma de la SCP.

1.3.2 Les traitements médicamenteux de la MP

Les traitements de la MP par les médicaments sont uniquement des traitements symptomatiques. Les thérapies par les médicaments visent à combler le déficit en DA relié à la MP.

1.3.2.1 La dopathérapie

La dopathérapie consiste à l'administration chronique de lévodopa (L-DOPA). Dans la section 1.1.4, il a été décrit que les symptômes de la MP étaient reliés à une déplétion majeure de la DA striatale. Après cette découverte importante, il a aussi été mis en évidence qu'un supplément en L-DOPA permettait de combattre le déficit en DA et les troubles moteurs de la MP (118). En fait, le L-DOPA est un précurseur biochimique de la DA.

Comme la figure 1.21 qui suit le démontre, la DA dérive d'un acide aminé essentiel, la tyrosine. Par la tyrosine hydroxylase (TH), la tyrosine est métabolisée en L-DOPA. Cette dernière est ensuite transformée en DA sous l'action de la dopa-décarboxylase (DC). De la DA peut ensuite dériver la noradrénaline et l'adrénaline. Puisque la MP est associée à une diminution de DA, pourquoi ne pas administrer directement des suppléments de DA plutôt que la L-DOPA? La DA ne traverse pas la BHE, tandis que la L-DOPA oui.

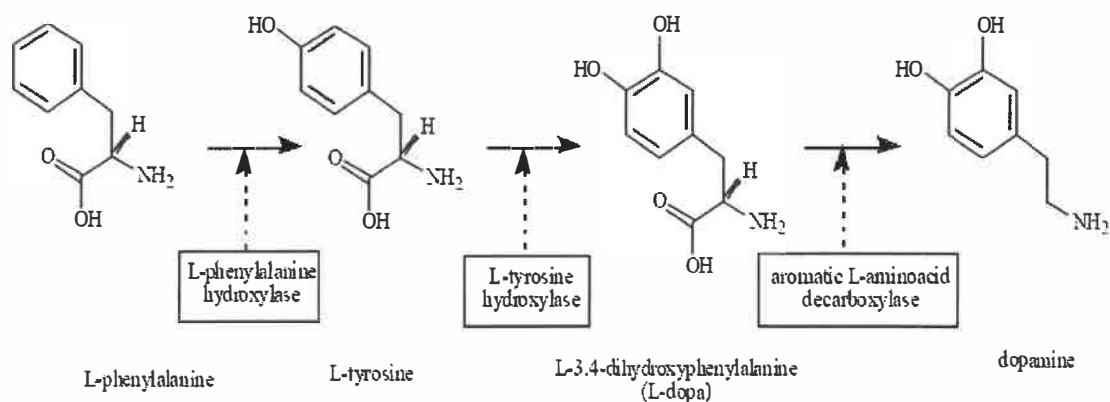


FIGURE 1.21: Formation de la DA à partir de la L-DOPA.

Depuis 1970, il existe deux marques commerciales de L-DOPA sur le marché : Modopar et Sinémet. Mais ces médicaments ne contiennent pas seulement la L-DOPA, ils contiennent aussi un inhibiteur de la DC (IDC). Son ajout est essentiel, puisque la DC est ubiquitaire et donc sans IDC, la L-DOPA serait immédiatement métabolisée en DA dans le système digestif avant même d'atteindre le cerveau. L'IDC ne traverse pas la BHE, alors seulement la L-DOPA peut se rendre au système nerveux et être métabolisée par la DC du système nerveux en DA.

L'administration de L-DOPA doit se faire plusieurs fois par jour, puisque l'absorption se fait très rapidement, de 20 minutes à deux heures. Après quelques heures déjà, les symptômes réapparaissent.

Plusieurs complications motrices sont associées à la L-DOPA thérapie. Au fil du temps, la réponse des patients à la L-DOPA diminue et très souvent des dyskinésies tardives (mouvements non contrôlés) peuvent se développer.

Ainsi, la dopathérapie à ce jour permet d'améliorer les symptômes de la maladie, mais à moyen terme. C'est pourquoi il y a toujours de la recherche qui tente de trouver des remplaçants à la L-DOPA ou des compléments permettant d'améliorer son efficacité.

1.3.2.2 Les agonistes DAergiques

Les agonistes DAergiques miment l'action de la DA sur les récepteurs DAergiques des cellules du striatum (qui reçoivent les efférences des neurones DAergiques), ce qui permet un bon fonctionnement de la voie nigro-striée.

Plusieurs classes d'agonistes sont connues, dont la lisuride, le ropinirole, le pergolide, le pramipexole, mais il n'en demeure pas moins que l'agoniste choisi par les thérapeutes depuis 1974 est la bromocriptine, associée à la marque commerciale Parlodel (10).

Le traitement aux agonistes DAergiques nécessite très souvent entre trois et quatre administrations par jour et leur effet est moins efficace que la L-DOPA, mais aucun effet secondaire moteur n'y est associé, contrairement à la L-DOPA. En fait, les agonistes DAergiques sont utilisés chez les patients parkinsonniens aux premiers stades. Ensuite, ils sont plutôt combinés à la L-DOPA pour diminuer les doses de L-DOPA utilisées puisqu'elle crée de forte hallucination visuelle. De plus, de récentes études cliniques contestent l'efficacité des agonistes DAergiques qui lient le récepteur D2, comme la bromocriptine (119). Ce sujet a été amplement traité dans la thèse de doctorat d'un étudiant de notre laboratoire, Keith Chiasson.

1.3.3 Les thérapies préventives

Récemment, le Dr. Béliveau, du Centre de Recherche de l'Hôpital Ste-Justine de Montréal, a publié le livre « Les aliments contre le cancer » (120). Ce livre démontre l'importance d'une alimentation riche en antioxydants pour prévenir le cancer. Dans ce même ordre d'idées, on pourrait associer une saine alimentation à la prévention de la MP. En effet, il a très bien été démontré au cours de cette présente introduction que la MP est une maladie dégénérative d'étiologie inconnue, mais on sait que certains processus, tels que le stress oxydatif et la neuroinflammation, contribuent grandement à augmenter les dommages neuronaux. Ainsi, grâce à une thérapie préventive, on fournirait au cerveau certains « outils » pour l'aider à se défendre contre ces processus destructeurs et donc prévenir l'apparition de cette maladie ou du moins ralentir sa progression. Ce type de thérapie préventive pourrait aussi être introduite à titre de thérapie complémentaire à la L-DOPA pour permettre une meilleure efficacité du traitement.

Dans les sociétés occidentales, la population vieillissante est de plus en plus composée d'adultes avec un niveau de scolarité élevé et donc qui sont plus sensibilisés à leur santé. Des médecins de famille et des neurologues rapportent que ces patients veulent participer de façon active à la prise en charge du choix thérapeutique pour leur santé. C'est avec ce type de personne qu'une thérapie complémentaire à la thérapie aux

médicaments peut être bénéfique. Plusieurs molécules naturelles sont à l'étude pour leur effet neuroprotecteur, mais dans notre laboratoire on s'est concentré sur les estrogènes et les phyto-estrogènes.

1.3.3.1 Les estrogènes (E)

Les recherches épidémiologiques rapportent que les femmes sont moins à risque que les hommes de développer la MP avant la ménopause (8). Après l'âge de 55 ans, le risque des femmes de développer la MP augmente avec l'âge par la suite. Les femmes qui ont subi une hystérectomie avant la ménopause sont aussi beaucoup plus à risque que la moyenne des femmes. Cependant, les femmes qui suivent les thérapies de remplacement des E (hormonothérapie) lors de leur ménopause, deviennent beaucoup moins à risque de développer la MP que les femmes n'en prenant pas (121). Toutes ces évidences ont mené à se questionner sur le rôle des E dans la neuroprotection contre la MP et plusieurs effets bénéfiques ont été associés aux E (9).

Plusieurs études, tant *in vitro* que *in vivo*, s'accordent pour dire que les E sont efficaces pour prévenir la maladie d'Alzheimer (122) et permettent aussi de mieux récupérer d'un choc ischémique cérébral (123). De plus, on s'accorde pour dire que les E permettent de prévenir la mort de différentes populations neuronales. Ils peuvent agir selon des mécanismes génomiques et non génomiques, tous favorisant la survie cellulaire, mais on ne s'entend pas encore sur l'importance de chacun des mécanismes dans la réelle protection fournie par les E.

La plupart des effets physiologiques des E sont surtout médiés via leur action sur les récepteurs à E α et β (ER α , ER β). On sait que contrairement au reste du corps où l'on retrouve qu'un seul type de ER, on retrouve ER α et ER β dans le cerveau. Probablement que les deux types de récepteurs sont impliquées dans la neuroprotection médiée par les E, puisque le ER α (124, 125) et le ER β (126) semblent fournir des effets bénéfiques contre la mort neuronale.

Le complexe E-récepteur peut se lier directement sur des séquences promotrices précises de certains gènes (élément de réponse aux E (ERE)). Ainsi, en liant le ERE, les E agissent directement sur la transcription de certains gènes. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que la neuroprotection impliquait essentiellement l'action génomique des E. En effet, l'ajout de certains antagonistes des ER (comme le tamoxifène (127) ou le ICI 182 780 (128)) bloquent complètement l'effet neuroprotecteur des E.

Plusieurs propriétés des E contribuent à leur pouvoir neuroprotecteur. On compte parmi ceux-ci leur effet antioxydant et anti-inflammatoire.

Effet antioxydant des E

Tout d'abord, les E sont de puissants antioxydants. Il ne va sans dire que cette action n'implique pas l'activation des ER (129). Leur structure polyphénolique et la présence de plusieurs groupes hydroxyles, notamment celui sur le cycle A en C3 semblent essentiels à l'activité antioxydante des E (figure 1.22). Ces groupements hydroxyles peuvent fournir des électrons aux radicaux libres et ainsi permettre de les neutraliser. Des études antérieures de notre laboratoire ont démontré que les E permettent de réduire la toxicité et la formation de radicaux libres induites par le MPP⁺ et le paraquat sur des cellules PC12 neuronales en culture (130, 131). De plus, les E semble protéger les neurones DAergiques du mésencéphale *in vitro* (132). Plusieurs études ont prouvé que le blocage des ER à l'aide d'un antagoniste (comme le MPP dihydrochloride) ne semblait pas affecter le pouvoir antioxydant des E contre un stress oxydatif (132). Les E ont aussi le pouvoir de réduire le niveau de peroxydation lipidique induite par le peptide β -amyloïde (133).

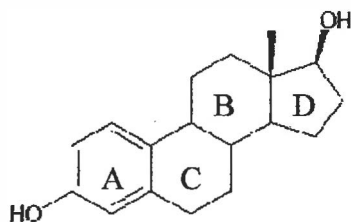


FIGURE 1.22: Structure chimique de l'estradiol.

Effet anti-apoptotique

Les E semblent aussi réduire la mort cellulaire programmée, ou l'apoptose (134, 134). Le traitement de cellules avec des E augmente le niveau d'expression de Bcl-2 et Bcl-xL, deux gènes anti-apoptotiques (135, 136). Les protéines Bcl-2 et Bcl-xL se situent sur la membrane mitochondriale et se dimérisent pour empêcher le relâchement de cytochrome C. Ce dernier est relâché lors de l'apoptose et est capable d'induire l'activation des caspases, étape finale de l'apoptose qui mène à la mort neuronale. L'ajout des E permettrait ainsi de diminuer le niveau d'apoptose des neurones. D'autres études ont démontré que les E peuvent aussi réduire le niveau d'expression de BAD et Nip-2, deux gènes qui favorisent l'initiation de l'apoptose des cellules neuronales (137). L'administration des E a aussi été reconnue pour diminuer le niveau de l'effecteur finale d'apoptose, la caspase-3 activée, induite par le glutamate (138).

Les E ont aussi démontré avoir un réel effet sur la voie de signalisation de la survie cellulaire PI-3K/Akt. La phosphorylation de Akt (pAkt) influence le niveau d'apoptose des cellules. En effet, pAkt tend à inhiber l'action de certains médiateurs d'apoptose, tels que BAD et certaines caspases, mais aussi pAkt a le pouvoir d'augmenter l'expression de Bcl-2 et Bcl-xL qui, rappelons-le sont deux molécules anti-apoptotiques. Il a été démontré que les E avaient le pouvoir d'activer la phosphorylation de Akt et donc, par cette action, ils peuvent diminuer le niveau d'apoptose des cellules (139).

Effet anti-inflammatoire

Un autre rôle des E qui leur confère des propriétés de neuroprotection est leur pouvoir anti-inflammatoire (140). Les E diminuent la production de molécules pro-inflammatoires et réduisent par le fait même l'activation de la microglie. En fait, la neuroprotection par les E contre l'ischémie cérébrale est associée à une atténuation de l'expression du TNF- α (141). De plus, il est démontré qu'un niveau physiologique des E prévient l'activation de la microglie induite par le LPS et est associé à un blocage de la production de facteurs pro-inflammatoires, tels que NO et PGE2 (142, 143). Enfin, le

niveau de MPP-3, protéine impliquée dans le recrutement du système inflammatoire lors de la mort neuronale, est aussi modulé à la baisse sous l'action des E (144). La diminution de tous ces facteurs pro-inflammatoires semble être sous une action génomique, soit dépendante des ER.

On peut ainsi conclure que le groupe des E est un des plus puissants agents neuroprotecteurs, tant comme agent antioxydant, anti-apoptotique et anti-inflammatoire. Ainsi, leur administration pourrait prévenir ou réduire la progression de la MP. La figure 1.23 qui suit résume bien les différents mécanismes de neuroprotection des E.

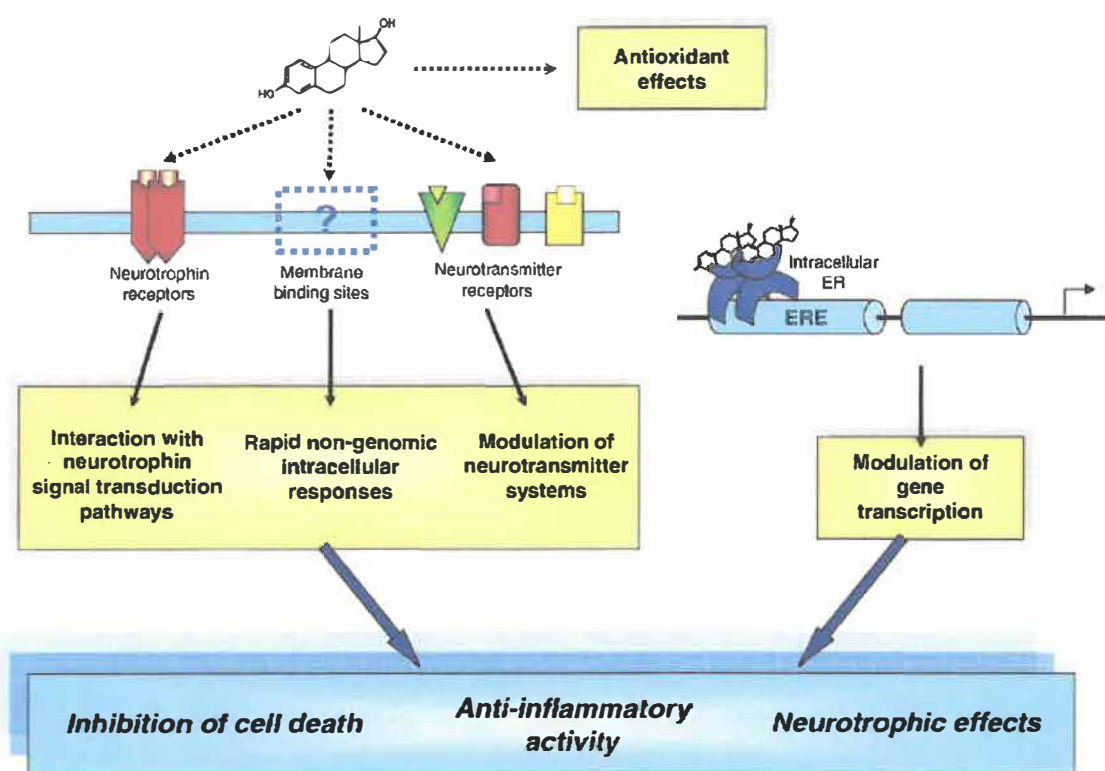


FIGURE 1.23: Résumé des différents mécanismes de protection des E (9).

Méfais des E

Cependant, une énorme étude clinique a été réalisée aux États-Unis, le « *Women Health Initiative (WHI)* » avec des femmes suivant la thérapie de remplacement des E à leur ménopause. L'étude a été interrompue en 2003 parce que les données démontraient que beaucoup plus de femmes que la normale avaient développé des cancers hormono-dépendants, tels le cancer de l'utérus, du sein et des ovaires (145, 146). Comme il a été

mentionné précédemment, les E ont la capacité d'activer les voies de survie cellulaire, entre autre la voie PI-3K/Akt. L'implication de cette voie fut maintes fois démontrée pour avoir un rôle crucial dans le développement de cancers (147). Ainsi, même si les E semblent puissants dans la protection contre les maladies neurodégénératives, la promotion de cancers hormono-dépendants fait des E des molécules difficilement utilisables comme thérapie préventive de la MP. C'est alors que notre recherche s'est dirigée vers les phyto-estrogènes, des molécules très similaires aux E, mais qui ne provoquent pas le développement de cancers.

Les phyto-estrogènes sont des molécules analogues aux E et sont d'origine végétale. On compte quatre grandes classes de phyto-estrogènes, les flavonoïdes, les isoflavonoïdes, les stilbènes et les lignans. Ils sont classés selon leur structure chimique. Plusieurs phyto-estrogènes furent étudiés dans notre laboratoire pour leur propriété d'antioxydants sur des cellules PC12 différenciées (130). Certains, comme la génistéine, ne démontraient aucun pouvoir à protéger les cellules contre la mort cellulaire. Cependant, le resvératrol et la quercétine ont démontré posséder une excellente capacité à prévenir la mort cellulaire des neurones, de même que de diminuer la quantité de radicaux libres dans les cellules suite à un stress oxydatif. Ces deux phyto-estrogènes sont de plus en plus prometteurs quant à leurs diverses propriétés.

1.3.3.2 Le resvératrol

Le resvératrol (figure 1.24) est un phyto-estrogène appartenant à la classe des stilbènes. Il est produit naturellement chez la plante lors d'une réponse à une infection aux champignons. En fait, le resvératrol est capable d'inhiber la prolifération des champignons, ce qui lui confère une classification de phyto-alexine (148). La figure 1.25 représente le mode de synthèse du resvératrol par la plante. Jusqu'en 1992, on ne portait pas vraiment d'importance au resvératrol, mais à ce moment, une publication de Siemann et Creasy (149) qui décrivait la présence de *trans*-resvératrol dans le vin rouge a fait croître l'engouement des chercheurs. En fait, il existe deux isomères du resvératrol, soit le *cis*- et le *trans*-resvératrol. La forme *cis* n'est pas beaucoup

considérée, car elle n'est pas très stable et elle est transformée presque immédiatement en forme *trans*. On ne détecte seulement que des traces de la forme *cis* du resvératrol dans le vin rouge. Plusieurs facteurs peuvent influencer la concentration de resvératrol retrouvé dans le vin, dont le climat, le type de champignon qui infecte les vignobles, le sol et les conditions de fermentation du vin (148). On ne retrouve presque pas de resvératrol dans le vin blanc, puisque dans le procédé de fabrication du vin blanc, on doit retirer la pelure du raisin, ainsi on élimine presque la totalité du resvératrol retrouvé dans le raisin. Dans la pelure fraîche de raisin, on retrouve des concentrations oscillant entre 50-100 µg de resvératrol par gramme de pelure (150), tandis que dans le vin rouge, on retrouve entre 1,5-3 mg/l de vin (151, 152). De même, on peut en retrouver près de 4 mg/l dans certains jus de raisins commerciaux (153). Le resvératrol possède de nombreuses propriétés bénéfiques pour le corps, dont la protection cardio-vasculaire, l'effet anti-cancéreux et l'effet antioxydant (154).

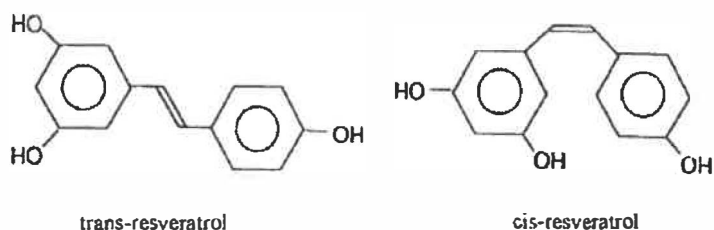


FIGURE 1.24: Structure chimique du trans- et cis-resvératrol.

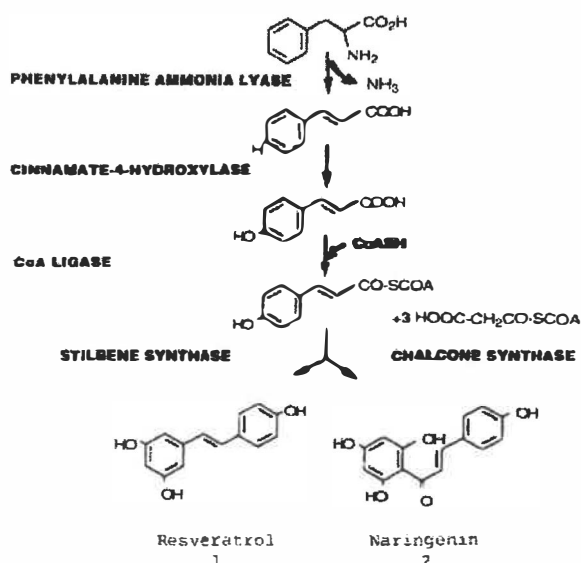


FIGURE 1.25: Voie de biosynthèse du resvératrol à partir de la phénylalanine chez la plante (148).

Activité estrogénique

L'avantage d'utiliser le resvératrol plutôt que les E comme thérapie préventive à la MP et même comme traitement post-ménopausal, c'est qu'il n'induit pas la formation de cancers hormono-dépendants. Plusieurs études ont révélé que le resvératrol lie les ER avec beaucoup moins d'affinité que les E, soit 7000 fois moins, ce qui réduirait beaucoup l'initiation de cancers hormono-dépendants (155).

Protection cardio-vasculaire par le resvératrol

Le resvératrol est une molécule très bien connue pour son large spectre d'effets biologiques. Depuis très longtemps, le resvératrol est connu car il semble être le premier responsable du « Paradoxe Français ». En fait, les Français ont une alimentation riche en acides gras saturés, mais pourtant ils ont une incidence de maladies cardio-vasculaires les plus faibles au monde. En fait, les Français consomment quotidiennement du vin rouge dans lequel on retrouve entre autre du resvératrol. Le resvératrol est reconnu pour moduler le métabolisme lipidique, de même que diminuer l'oxydation des lipoprotéines à faible densité (156) et l'agrégation plaquettaire (157). Ceci contribue grandement à prévenir les maladies cardio-vasculaires (158).

Effet anti-cancéreux du resvératrol

Le resvératrol possède aussi un fort pouvoir pour inhiber l'initiation, la promotion et la prolifération des cellules cancéreuses (153). Même si les mécanismes d'action ne sont pas encore totalement connus, on sait par contre que l'effet anti-cancéreux du resvératrol serait attribué entre autre à son pouvoir de promouvoir l'apoptose des cellules cancéreuses. Le resvératrol a un effet direct sur l'inhibition de la prolifération cellulaire des cellules épithéliales du cancer du sein et peut induire l'apoptose des cellules leucémiques HL60 aussi bien que des cellules cancéreuses du sein T470 (159). En fait, une étude a démontré que le resvératrol était un inhibiteur efficace de la croissance cellulaire et induisait l'arrêt de la prolifération cellulaire au cycle G1/S sur des cellules du cancer de la prostate (160). Il peut aussi induire l'apoptose de cellules du cancer du

colon de façon dose dépendante (161). Une des voies impliquées dans l'initiation de l'apoptose serait la voie de p53, un gène très important dans la suppression de tumeur. Sur des cellules normales (p53^{+/+}), le resvératrol est capable d'induire l'apoptose, mais sur une lignée cellulaire déficiente en p53 (p53^{-/-}), le resvératrol est incapable d'induire l'apoptose de ces cellules (162). Le resvératrol pourrait aussi agir sur les voies de c-Jun kinase NH2-terminal (JNK). La figure 1.26 qui suit schématise quelques mécanismes de chémoprotection du resvératrol.

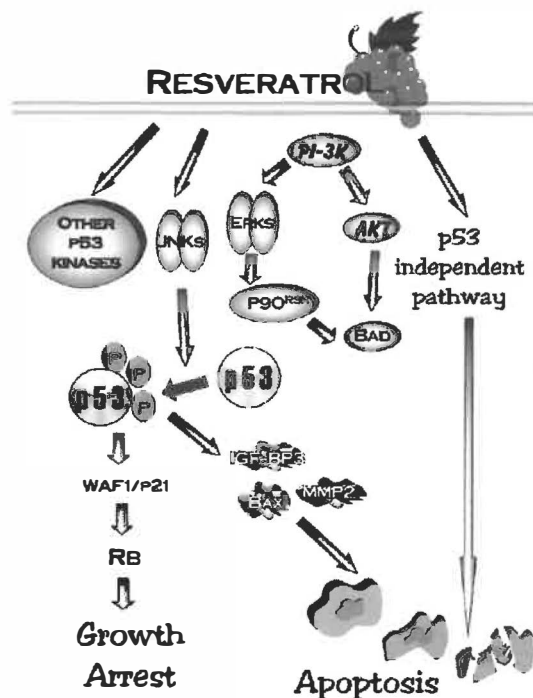


FIGURE 1.26: Pouvoir anti-cancéreux du resvératrol par l'activation des voies apoptotiques (153).

Effets antioxydant et anti-apoptotique du resvératrol

Même si le resvératrol présente plusieurs propriétés intéressantes, il fut en premier lieu connu pour son pouvoir antioxydant et sa capacité de protéger contre l'apoptose des cellules neuronales. D'abord, des études de notre laboratoire et d'autres ont démontré que le resvératrol pouvait diminuer la toxicité induite par le MPP⁺ sur des cellules PC12 neuronales (130) et des cultures primaires du mésencéphale (163). Le resvératrol peut aussi agir et augmenter la voie de signalisation de la réponse antioxydante de la hème-oxygénase (HO-1) sur des cultures neuronales primaires (164, 165). De plus, le

resvératrol a le pouvoir de réduire l'apoptose induite par le H_2O_2 sur des cellules PC12. En fait, le H_2O_2 produit des radicaux libres qui peuvent détruire les molécules biologiques et induire l'apoptose des cellules. Le traitement avec le resvératrol semble diminuer la fragmentation de l'ADN causée par l'apoptose en plus d'une diminution de l'activation de NF- κ B (facteur de transcription important dans la réponse au stress oxydatif) (166).

Mais pourquoi le resvératrol a la capacité d'induire l'apoptose sur des lignées cancéreuses et d'inhiber l'apoptose sur certaines cellules, dont les cellules neuronales? La question est toujours en vigueur. Cependant, on peut se questionner sur l'origine même des deux types de lignées cellulaires. On sait que le cycle cellulaire des cellules cancéreuses est complètement déséquilibré et que ces cellules se divisent de façon anarchique. Les cellules neuronales, quant à elles, sont des cellules différenciées et leur processus de division cellulaire est arrêté en G_0 . Ainsi, on pourrait tout simplement croire que les cellules ne répondent pas de la même façon au resvératrol. Des études dans notre laboratoire sont en cours sur l'effet du resvératrol sur l'expression de molécules apoptotiques afin de mieux comprendre son mécanisme d'action.

Effet anti-inflammatoire

Depuis tout récemment, on s'intéresse au pouvoir anti-inflammatoire du resvératrol dans divers systèmes (154, 167). L'ajout de resvératrol à des lignées cellulaires et des cultures primaires de la microglie diminue la production de TNF- α et de NO induite par le LPS (168). De plus, il est démontré que le resvératrol est capable de diminuer l'activité des COX-2 et de iNOS, responsable de la production respective de PGE et de NO (154, 169). Même si le mécanisme par lequel le resvératrol inhibe l'inflammation n'est pas complètement connu, on sait qu'il agit au niveau de la production de facteurs pro-inflammatoires et semble médier, entre autre, l'inhibition de l'activation de NF- κ B (170). En fait, le resvératrol pourrait interagir avec le domaine ankyrin de I κ B (l'inhibiteur de NF- κ B, rappelons-le) et prévenir sa phosphorylation empêchant ainsi l'activation de NF- κ B et l'initiation de la réponse inflammatoire (170). De plus, le

resvératrol possède le pouvoir d'inhiber des protéines tyrosines kinases qui seraient responsable de l'activation de NF-kB (171).

1.3.3.3 La quercétine

La quercétine (figure 1.27) est un phyto-estrogène appartenant à la classe des flavonoïdes. Cette molécule peut être retrouvée en grande quantité dans le thé vert, la pomme, les oignons et les arachides. On estime que notre consommation quotidienne en quercétine est de quelques centaines de milligrammes (172). Cependant, la quercétine est beaucoup moins étudiée que le resvératrol, pourtant elle possède de très bons effets biologiques, tels que la capacité à inhiber l'agrégation plaquettaire, elle fournit une bonne protection cardio-vasculaire, possède un bon pouvoir anti-inflammatoire et aurait même de bonnes propriétés antivirales (173).

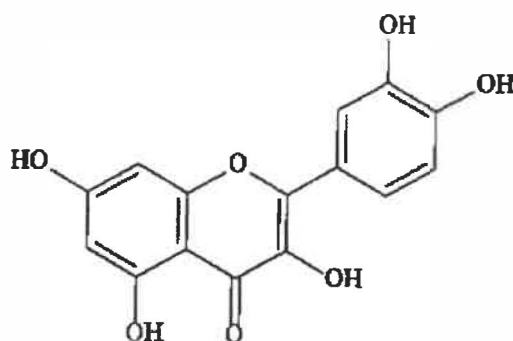


FIGURE 1.27: Structure chimique de la quercétine.

Effet antioxydant de la quercétine

La quercétine est reconnue pour ses propriétés d'antioxydant. Une étude du pouvoir antioxydant de différents polyphénols a été réalisée par la mesure de l'activité antioxydante équivalente au Trolox (TEAC). Ceci consiste à la capacité de l'antioxydant à neutraliser, par un don d'hydrogène, un ion donné et est mesuré par une modification de l'absorbance. La valeur de référence fixée à 1 appartient au Trolox (figure 1.28) et les valeurs des autres antioxydants sont données par rapport à cette valeur. L'étude a démontré que la quercétine possède un des meilleurs pouvoirs antioxydant, même

comparé au resvératrol. La figure 1.29 qui suit donne les valeurs de TEAC de différents polyphénols (174). La quercétine est aussi capable de chélater des métaux de transitions, comme le fer. On sait que le fer est impliqué dans la réaction de type Fenton avec le H_2O_2 pour produire les radicaux libres (se référer à la section 1.2.2.2). Ainsi, la capacité de la quercétine à capter le fer permet de réduire la formation de radicaux libres et il semble que le groupe cathécol de la quercétine participerait à la chélation des métaux (175). De plus, la quercétine est capable d'inhiber la peroxydation lipidique (176).

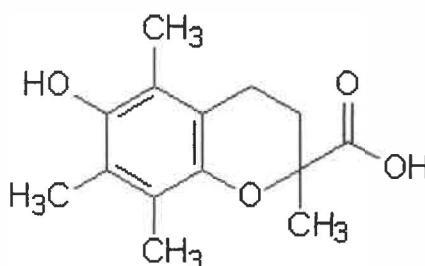


FIGURE 1.28: Structure chimique du Trolox.

Compound	Free OH-Substituents	Glycosylated Position	TEAC (mM)	n	Family
Epicatechin gallate	3, 5, 7, 3', 4', 3'', 4'', 5''		4.9 ± 0.02	[3]	flavanol
Epigallocatechin gallate	3, 5, 7, 3', 4', 5', 3'', 4'', 5''		4.8 ± 0.06	[3]	flavanol
Quercetin	3, 5, 7, 3', 4'		4.7 ± 0.1	[6]	flavanol
Delphinidin	3, 5, 7, 3', 4', 5'		4.44 ± 0.11	[5]	anthocyanidin
Cyanidin	3, 5, 7, 3', 4'		4.4 ± 0.12	[5]	anthocyanidin
Epigallocatechin	3, 5, 7, 3', 4', 5'		3.8 ± 0.06	[3]	flavanol
Keracyanin	5, 7, 3', 4'	3-rut	3.25 ± 0.1	[3]	anthocyanin
Myricetin	3, 5, 7, 3', 4', 5'		3.1 ± 0.30	[6]	flavanol
Gallic acid	3, 4, 5		3.01 ± 0.05	[7]	hydroxybenzoate
Ideain	5, 7, 3', 4'	3-gal	2.9 ± 0.03	[3]	anthocyanin
Morin	3, 5, 7, 3', 4', 5'		2.55 ± 0.02	[3]	flavanol
Epicatechin	3, 5, 7, 3', 4'		2.5 ± 0.02	[6]	flavanol
Gallic acid methyl ester	3, 4, 5		2.44 ± 0.03	[3]	hydroxybenzoate
Catechin	3, 5, 7, 3', 4'		2.4 ± 0.05	[9]	flavanol
Rutin	5, 7, 3', 4'	3-rut	2.4 ± 0.06	[7]	flavanol
Apigenidin	5, 7, 4'		2.35 ± 0.2	[4]	anthocyanidin
Peonidin	3, 5, 7, 4'	3'-OMe	2.22 ± 0.2	[4]	anthocyanidin
Luteolin	5, 7, 3', 4'		2.1 ± 0.05	[4]	flavone
Malvidin	3, 5, 7, 4'	3',5'-di-OMe	2.06 ± 0.1	[4]	anthocyanidin
Taxifolin	3, 5, 7, 3', 4'		1.9 ± 0.03	[6]	flavanone
Oenin	5, 7, 4'	3',5'-diOMe	1.78 ± 0.02	[3]	anthocyanin
Luteolin-4'-glucoside	5, 7, 3'	3-gluc	1.74 ± 0.09	[4]	flavone
Naringenin	5, 7, 4'	4'-gluc	1.53 ± 0.05	[4]	flavanone
Apigenin	5, 7, 4'		1.45 ± 0.08	[6]	flavone
Chrysin	5, 7		1.43 ± 0.07	[6]	flavone
Hesperitin	3, 5, 7, 3'	4'-OMe	1.37 ± 0.08	[3]	flavanone
Kaempferol	3, 5, 7, 4'		1.34 ± 0.08	[6]	flavanol
Pelargonidin	3, 5, 7, 4'		1.30 ± 0.1	[6]	anthocyanidin
Hesperidin	3, 5, 3'	4'-OMe	1.08 ± 0.04	[5]	flavanone
Luteolin-3',7'-diglucoside	5, 4'	7-rut	0.79 ± 0.04	[4]	flavone
Narirutin	5, 4'	3',7'-digluc	0.76 ± 0.05	[3]	flavanone

FIGURE 1.29: Activité antioxydante équivalente au Trolox de plusieurs phyto-estrogènes (174).

Effet anti-cancéreux de la quercétine

Il est connu depuis très longtemps que la quercétine est un puissant inhibiteur de la tyrosine kinase, ce qui a pour effet de moduler les voies de signalisation de la survie cellulaire PI-3K/Akt et ERK1/2 et inhibe la voie des cyclines Cdk2 impliquée dans la division cellulaire (177).

Une équipe a étudié à quel stade de la division cellulaire la quercétine est capable d'agir pour bloquer la prolifération des cellules tumorales. Ils ont constaté que l'ajout de quercétine réduisait la quantité de Cdk2. Cette cycline régit la phase S de la division cellulaire. De cette façon, la quercétine est capable d'inhiber la prolifération des cellules tumorales (177). De plus, ils ont vérifié le niveau d'expression de PI-3K et son niveau est abaissée en présence de quercétine (177).

Effet anti-inflammatoire de la quercétine

Peu de recherche a été faite pour déterminer le rôle anti-inflammatoire de la quercétine. Mais un groupe de recherche a isolé trois flavonoïdes d'une plante (*Waltheria indica*). Cette plante est reconnue pour ses bienfaits, dans les médecines orientales, pour traiter les maladies inflammatoires, comme les rhumatismes. Des trois flavonoïdes isolés, ils ont identifié la présence de quercétine par spectroscopie. Ils ont ensuite vérifié le pouvoir anti-inflammatoire de l'extrait de quercétine purifié et ils ont constaté que la quercétine réduit l'inflammation induite par le LPS, de même que la production de NO, TNF- α , IFN- γ et d'IL-12 (178).

1.4 Hypothèses et objectifs de recherche

Comme il a été discuté dans ce chapitre d'introduction, la MP est une maladie neurodégénérative d'étiologie encore inconnue. Toutefois certains processus, tels la neuroinflammation et le stress oxydatif sont aujourd'hui reconnus pour contribuer à l'enclenchement du processus d'apoptose des neurones DAergiques. Ainsi, le premier

objectif de ma recherche était de vérifier si le resvératrol et la quercétine pouvaient réduire directement le niveau de mort apoptotique induit par un oxydant sur des neurones DAergiques en culture.

Le second objectif de ma recherche était de démontrer le pouvoir anti-inflammatoire du resvératrol et de la quercétine dans les cellules nerveuses. Comme il a été mentionné précédemment, le phénomène de neuroinflammation a pour conséquence de produire des facteurs pro-inflammatoires toxiques pour les neurones DAergiques. Si les deux phyto-estrogènes étudiés démontrent un pouvoir anti-inflammatoire, les dommages inflammatoires aux neurones pourraient ainsi être réduits. Pour réaliser mon deuxième objectif, j'ai étudié le niveau d'expression de deux cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 α et le TNF- α , qui servent de marqueur d'inflammation. Ces marqueurs furent étudiés à la suite du traitement aux phyto-estrogènes et au LPS de cellules microgliales en culture. Ensuite, un système de co-culture fut utilisé pour reproduire l'interaction entre les neurones et la microglie et d'y vérifier l'effet d'une activation microgliale au LPS sur la mort neuronale et de l'effet d'un traitement avec les phyto-estrogènes.

Si les phyto-estrogènes démontrent le pouvoir de réduire la mort neuronale induite par le stress oxydatif et la neuroinflammation, il sera alors possible de bloquer la boucle d'amplification de la mort cellulaire impliquée dans la MP et ainsi réduire la progression de la maladie.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel utilisé pour l'objectif # 1

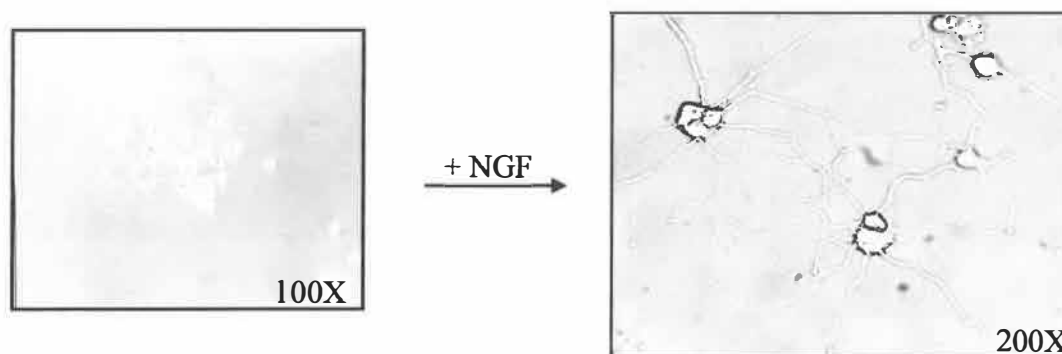
Les cellules PC12 ont été achetées chez American Type Culture Collection (Rockville, MD). On s'est procuré chez Sigma (Ontario, Canada) le facteur de croissance du nerf 7s (NGF), le milieu de culture RPMI-1640, le resvératrol, la quercétine, le MPP⁺, de même que le Hoechst 33342. Le sérum bovin fœtal (FBS) et le sérum de cheval (HS) proviennent de chez Life Technologies (Ontario, Canada). Les deux trousse de Terminal dUTP nicked-end labelling (TUNEL) et de dosage de lactate déshydrogénase (LDH) ont été achetés chez Roche (Québec, Canada).

2.2 Traitement des cellules

Pour vérifier la propension du resvératrol et la quercétine à protéger les neurones contre le processus de mort apoptotique, la lignée cellulaire PC12 a été utilisée (voir figure 2.1). Les cellules PC12 sont des cellules provenant de phéochromocytomes de la surrénale de rat. Ces cellules sont dites catécholaminergiques puisqu'elles produisent la DA, la noradrénaline et l'adrénaline. La différenciation des cellules PC12 en une lignée neuronale uniquement DAergique est réalisée à l'ajout de NGF (figure 2.1) (179). De plus, les PC12 différenciées produisent des neurofilaments (180) et expriment les ER α et β , de même que le DAT (130).

Les cellules PC12 sont maintenues en vie dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère humide à 5% de CO₂. Ces cellules non différenciées sont cultivées dans un milieu de culture RPMI-1640 supplémenté avec 5% de HS décomplémenté à la chaleur et 10% de FBS décomplémenté à la chaleur. Le milieu est changé tous les deux jours. La différenciation des cellules PC12 se fait pour neuf jours par l'ajout de 50 ng/mL de NGF dans un milieu de culture RPMI-1640 contenant 1% de FBS, changé à tous les deux

jours. Le milieu 1% FBS est utilisé pour empêcher les cellules de se diviser et permettre aux cellules d'entrer en phase de différenciation.



**FIGURE 2.1 : Cellules PC12. À gauche : PC12 natives.
À droite : PC12 différenciées au NGF.**

Afin de vérifier le pouvoir du resvératrol et de la quercétine à réduire le niveau de mort cellulaire induite par le MPP^+ , les cellules PC12 différenciées ont d'abord subi un pré-traitement de trois heures avec un des deux phyto-estrogènes, à raison de $0,1\mu\text{M}$. Après trois heures, du resvératrol ou de la quercétine est rajouté pour maintenir la concentration (pour éviter l'effet de dilution lors de l'ajout de l'oxydant), puis l'oxydant est ajouté, en l'occurrence le MPP^+ . Le traitement des cellules PC12 différenciées avec $100\mu\text{M}$ se fait pour une période de 24 heures (figure 2.2). Chacune des doses utilisées proviennent de l'étude de doses réponses réalisées antérieurement (130). La figure qui suit résume les périodes de traitements avec les phyto-estrogènes et le MPP^+ . La rationnelle d'utiliser les phyto-estrogènes en pré-traitement s'explique par le fait que nous voulons reproduire la consommation quotidienne en phyto-estrogènes d'une personne au plan cellulaire. En fait, une personne s'alimente en phyto-estrogènes tout au long de sa vie et lors d'un stress oxydatif (qui est progressif) la personne possède déjà les défenses des phyto-estrogènes. Ainsi, sur notre modèle cellulaire, nous fournissons aux cellules une source de phyto-estrogènes, puis nous induisons un stress oxydatif. De plus, des études antérieures dans notre laboratoire ont démontré que l'administration de phyto-estrogènes sans pré-traitement ne protège pas les cellules contre un stress oxydatif, puisqu'il faut laisser le temps à ces molécules de pénétrer dans les cellules (données non présentées).



FIGURE 2.2 : Traitements avec les phyto-estrogènes et le MPP⁺ des cellules PC12.

2.3 Mesure du niveau de mort cellulaire

Le dosage de la LDH a été réalisé afin de mesurer le pouvoir antioxydant et donc, le pouvoir de prévenir la mort cellulaire du resvératrol et de la quercétine. Lors du processus de mort cellulaire, la cellule relâche, entre autre, dans son environnement un enzyme qui est la LDH. La LDH normalement sert à convertir le lactate en pyruvate. On utilise donc la présence de LDH dans le milieu et de son activité enzymatique pour mettre en évidence le pourcentage de mort cellulaire. Les cellules sont cultivées dans un volume de 200 μ L sur des plaques 96 puits, ce qui permet d'effectuer plusieurs répétitions d'un même traitement. Chacune des conditions est répétée un minimum de six fois. Suite au traitement des cellules avec le produit désiré et/ou l'oxydant, le surnageant de chacun des puits est prélevé à raison de 100 μ L. Le surnageant contient une quantité de LDH qui est proportionnelle au niveau de mort cellulaire. En effet, plus il y a de mort cellulaire dans la condition traitée, plus il y aura d'enzyme relâché dans le milieu de culture (130). Ensuite, une réaction colorimétrique est effectuée pour doser la quantité de LDH retrouvée dans le surnageant. Du lactate est ajouté au surnageant, de même que du sel de tétrazolium, du NADH^+ et un catalyseur fourni dans la trousse de Roche. Ainsi, la LDH du surnageant pourra convertir le lactate en pyruvate de façon proportionnelle à sa quantité avec l'aide du NADH^+ . Le $\text{NADH} + \text{H}^+$ obtenu pourra fournir deux protons au sel de tétrazolium qui sera converti en sel de formazan qui est d'une couleur rouge et dont l'absorbance pourra être mesurée à 490nm. La figure 2.3 représente la réaction pour le dosage colorimétrique de la LDH. Pour obtenir ensuite le niveau de mort cellulaire, il suffira de soustraire d'abord la valeur d'absorbance représentant le niveau de mort basale (*low control*) et d'en faire le rapport ensuite sur le niveau de mort maximale (*high control*) (voir équation 2.1). Pour obtenir le niveau de mort basale, les cellules ne subissent aucun traitement et sont incubées seulement avec

du milieu de culture, tandis que la mort maximale des cellules est obtenue en traitant les cellules avec du Triton-X 100, un détergent puissant qui perméabilise toutes les membranes cellulaires.

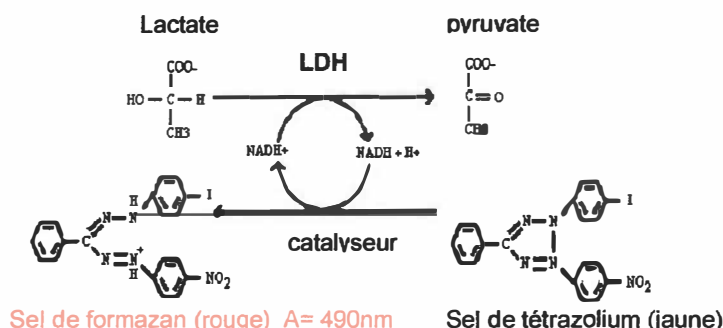


FIGURE 2.3 : Réaction colorimétrique du dosage de la LDH.

$$\% \text{ mort cellulaire} = \left(\frac{(A_{490\text{nm}} - \text{low})}{(\text{high} - \text{low})} \right) * 100$$

Formule pour évaluer le pourcentage de mort cellulaire

[2.1]

2.4 Marquage des cellules en apoptose

Mon premier objectif de maîtrise était de déterminer d'une part, si le MPP⁺ est capable d'induire la mort neuronale par apoptose et d'autre part, si le resvératrol ou la quercétine possèdent un pouvoir anti-apoptotique pour ainsi réduire le niveau de mort neuronale. Pour ce faire, un marquage des noyaux en apoptose a été réalisé par la technique de TUNEL. En fait, l'une des dernières étapes du processus de mort apoptotique consiste à la fragmentation de l'ADN en petits fragments. La technique de TUNEL permet d'ajouter à l'extrémité 3'OH de chacun des fragments d'ADN des dUTP liés à une fluorescéine avec l'aide d'un enzyme, la transférase de déoxynucléotides terminaux (TdT). Ainsi, chacun des fragments d'ADN est marqué par des molécules de fluorescéine visible en microscopie fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 450nm et d'émission de 515nm. Cependant, les cellules qui ne sont pas en apoptose, l'ADN est intacte et donc une seule molécule de dUTP-fluorescéine sera ajoutée à

l'extrémité 3'OH; ce ne sera pas suffisant pour être visible en fluorescence. La figure 2.4 suivante schématise la technique de TUNEL.

Ensuite, pour évaluer le pourcentage de cellules en apoptose dans chacune des conditions, un marquage de tous les noyaux a été réalisé avec le Hoechst 33342. Ce marqueur nucléaire s'insère entre les bases A et T de l'ADN, ce qui permet de visualiser tous les noyaux sans aucune restriction en microscopie à fluorescence (d'une couleur visible bleue). La longueur d'onde d'excitation du Hoechst 33342 est de 340nm et la longueur d'onde d'émission est de 510nm. Pour obtenir le pourcentage d'apoptose, un décompte des noyaux totaux (cellules marquées au Hoechst) et des noyaux en apoptose (cellules marquées au TUNEL) fut réalisé. Ainsi, il sera possible de faire un ratio des cellules en apoptose sur le nombre de cellules total.

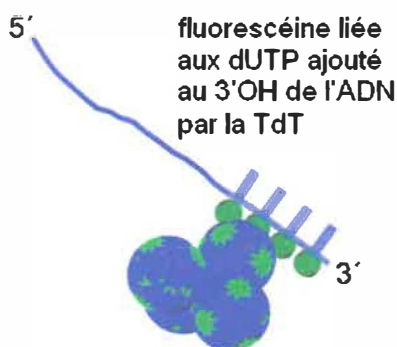


FIGURE 2.4 : Schématisation de la technique de TUNEL.

2.5 Matériel utilisé pour l'objectif # 2

Les colonnes d'extraction d'ARN total GenElute, le LPS, le Hot MasterMix, les dNTPs et le milieu de culture DMEM-F12 ont été commandé chez Sigma (Ontario, Canada). Les amorces ont été synthétisées chez Sigma Genosys (Ontario, Canada). La Transcriptase Réverse et son tampon de réaction ont été achetés chez New England BioLab (MA, États-Unis). Les inserts ayant des pores de 0,4µm proviennent de chez BD Falcon (New Jersey, États-Unis). Finalement, les cellules microgliales N9 ont été généreusement fournies par le Dr Luc Vallières, du CRCHUL de Québec.

2.6 Traitements de cellules

La première partie du second objectif était de vérifier si le resvératrol et la quercétine permettent de réduire l'activation de la microglie induite par le LPS. Pour ce faire, la lignée cellulaire de la microglie N9 fut utilisée (voir la figure 2.5). Cette lignée cellulaire murine est une lignée microgliale immortalisée et fut très bien décrite par Dimayuga (181). Cette lignée cellulaire exprime les marqueurs de surface typiques de la microglie *in vivo*, comme les complexes majeurs d'histocompatibilités et les récepteurs aux cytokines. La figure 2.6 résume les réponses aux différents marqueurs de surface testés sur les cellules N9. On peut remarquer que les cellules N9 possèdent les ER α et β , ce qui est intéressant pour notre étude avec les phyto-estrogènes, puisqu'une partie de leur effet, quoique faible, peut être médiée par ces récepteurs. De plus, cette lignée cellulaire répond bien à la stimulation au LPS et plusieurs études de l'inflammation du système nerveux utilisent cette lignée de choix (168, 182).

Les cellules N9 sont cultivées dans un incubateur humide à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO₂ dans du milieu DMEM-F12 supplémenté avec 10% de HS décomplémenté à la chaleur.

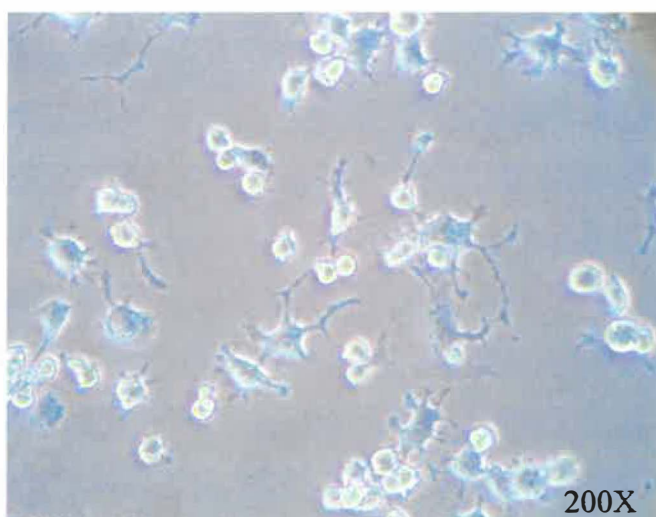


FIGURE 2.5 : Cellules microgliales N9.

Determination of cell surface phenotype of N9 microglia by flow cytometric analysis

Surface phenotype of N9 cells			
Antibody specificities	Clone	% Positive cells	S.E.M.
<i>Receptors for antigen</i>			
H-2D ^k	15-5-5	72.04	2.936
H-2K ^k	36-7/5	72.45	2.999
Pan a-MHC-I	2G5	98.77	0.129
MHC-II	IBL-5/22	42.40	1.659
MHC-II/RT1Bu	P7/7	99.17	0.102
TLR-4/MD2	MTS 510	96.63	2.947
Scavenger receptor, macro	ED31	94.43	3.203
<i>Costimulatory/activation molecules</i>			
CD8	KT15	17.63	1.898
CD19	6D5	13.60	1.863
CD28	37.51	97.70	0.206
CD40	3/23	38.35	4.307
CD45	30-F11	95.73	0.381
CD80/B7-1	1G10	40.09	3.016
CD86/B7-2	GL1	54.95	3.995
CD152 (CTLA-4)	4F10	69.68	4.881
CD154 (CD40L)	MR1	19.73	0.888
<i>Cytokine receptors</i>			
CD119 IFN- γ receptor	GR20	36.51	3.201
CD120a TNFR1, p55	HM104	21.04	1.428
CD120b TNFR2, p75	HM102	97.05	0.628
<i>Apoptosis molecules</i>			
CD95/Fas	Jo2	91.47	1.699
CD178/Fas ligand	MFL4	71.54	3.149
<i>Complement, adhesion, and Fcγ receptors</i>			
CD11b	MI/70	80.58	2.965
CD64 (Fc γ RI)	P*	79.23	4.432
CD16/32 (Fc γ RII and Fc γ RIII)	2.4G2	99.75	0.032
F4/80 (160 kD surface glycoprotein)	CL:A3-1	94.11	0.251
<i>Estrogen receptors</i>			
ER- α (N9)	P*	96.99	1.365
ER- α (HT22)	P*	0.31	0.125
ER- β (N9)	P*	92.74	2.441
ER- β (HT22)	P*	0.38	0.066

FIGURE 2.6 : Récepteurs de surface étudiés chez les cellules N9 (181).

Afin de vérifier le pouvoir anti-inflammatoire du resvératrol ou la quercétine, les cellules N9 sont d'abord pré-traitées avec le resvératrol ou la quercétine (0,1 μ M) pour trois heures, tel que décrit à la section 2.2 (130). Ensuite, le LPS est ajouté à 1 μ g/ml pour 24 heures. Une dose réponse pour le LPS a été effectuée afin de cibler la concentration idéale pour induire l'inflammation et cette dose est en accord avec la littérature (168, 182, 183). Des expériences avec le resvératrol et la quercétine sans faire le pré-traitement de trois heures ont aussi été réalisées.

2.7 Étude de l'expression de deux gènes pro-inflammatoires par RT-PCR

Deux marqueurs pro-inflammatoires, l'IL-1 α et le TNF- α , furent étudiés pour évaluer le niveau d'inflammation. Suite aux différents traitements décrits précédemment, l'ARN

fut d'abord extrait à l'aide de colonne d'extraction d'ARN total. 1µg d'ARN était ensuite utilisé pour faire une phase de Transcription Réverse (RT) pour produire de l'ADN complémentaire. Pour chacune des conditions traitées, le niveau d'expression de IL-1 α et TNF- α a été mesuré par PCR avec des sondes spécifiques à chacun des gènes. La figure 2.7 suivante indique les séquences utilisées pour chacun des gènes (182). Afin de s'assurer qu'une même quantité d'ARN de départ était utilisée, deux gènes contrôles ont été utilisés, soit l'actine et le GAPDH. Ces deux gènes sont fréquemment utilisés dans la littérature comme contrôle interne, car ils ne sont pas affectés par les conditions de traitement. Le produit le PCR est ensuite séparé sur un gel d'agarose 1,5%, contenant 1,5µg/mL de bromure d'éthidium. Les images furent acquises à l'aide d'un système d'imagerie FluorChem XP d'Alpha Innoteck (Californie, États-Unis) et l'analyse de l'intensité des bandes fut réalisée avec le logiciel du FluorChem XP, l'AlphaEase FC, la version 4.0. Chacune des analyses fut réalisée 3 fois.

IL-1 α sens	AAGATGTCCAACCTTCACCTTCAAGGAGAGCCG	491 pb
IL-1 α anti-sens	AGGTCGGTCTCACTACCTGTGATGAGTTTGG	
TNF- α sens	TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC	354 pb
TNF- α anti-sens	GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG	
actin sens	ATCCTGAAAGACCTCTATGC	270 pb
actin anti-sens	AACGCAGCTCAGTAACAGTC	
GAPDH sens	ACCACAGTCCATGCCATCAC	452 pb
GAPDH anti-sens	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	

FIGURE 2.7: Séquences des sondes utilisées pour le PCR.

2.8 Système de co-culture

Un système de co-culture a été mis au point afin de répondre à la deuxième partie de l'objectif # 2 qui était de vérifier si la présence de microglie activée induisait la mort des PC12 différenciées en neurones et de vérifier aussi si le resvératrol et la quercétine permettaient de diminuer cette mort neuronale. Premièrement, les cellules microgliales N9 furent mises en culture sur des inserts. Ces inserts ont des pores de 0,4µm qui permettent l'échange des facteurs pro-inflammatoires, sans toutefois qu'il y ait de contact entre les cellules. Pendant ce temps, les cellules PC12 furent cultivées sur des coverslips pré-traités avec la poly-L-lysine dans le fond de 24 puits. Dans un premier

temps, les cellules N9 furent traitées avec le LPS pour les activer. Ensuite, les inserts contenant les cellules N9 activées furent transférés, sans être lavées, en présence des PC12 pour 24 heures. Ainsi au cours de cette incubation, il y a l'échange de facteurs pro-inflammatoires de l'environnement des cellules N9 vers les cellules PC12 qui peuvent causer la mort de ces dernières.

Après la période de traitement, le milieu surnageant des PC12 fut prélevé pour mesurer le niveau de mort cellulaire par le dosage de la LDH. Les coverslips contenant les PC12 sont aussi utilisés pour marquer tous les noyaux au Hoechst et vérifier la présence de noyaux apoptotiques par TUNEL, tel que décrit à la section 2.4. Un marquage a aussi réalisé de la caspase-3 activée qui, rappelons-le, est un autre marqueur d'apoptose très spécifique. La présence de caspase-3 activée se fait en immuno-fluorescence où un anticorps primaire contre la caspase-3 activée, produit chez la souris, est incubé avec les cellules PC12 pour deux heures. Après quelques lavages, un anticorps secondaire anti-souris lié à une molécule fluorophore de Cy3 (λ_{ex} : 550nm, $\lambda_{ém}$: 570nm) est incubé en présence des PC12 toute la nuit à 4°C. Les marquages ont été visualisés par microscopie à fluorescence.

Afin de vérifier le pouvoir du resvératrol et de la quercétine à diminuer la mort neuronale induite par les N9 activées, un pré-traitement des cellules microgliales avec chacun des phyto-estrogènes fut réalisé trois heures avant le traitement avec le LPS, tel que décrit précédemment. La figure 2.8 illustre le montage de co-culture utilisé et la figure 2.9 explique les temps de traitement.

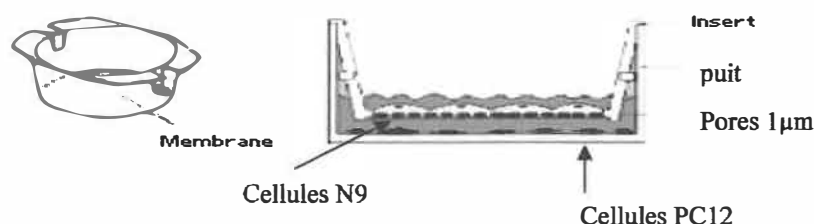


FIGURE 2.8 : Schéma de la co-culture des cellules N9 et de PC12.

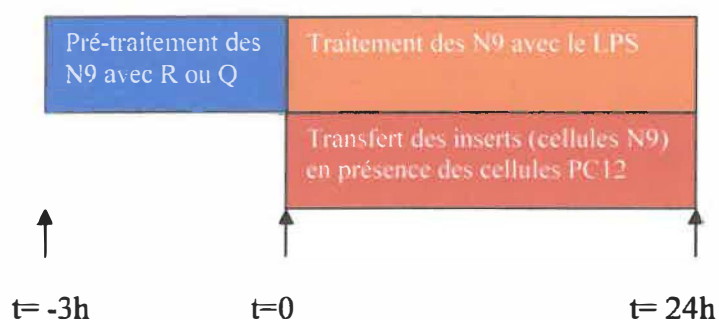


FIGURE 2.9 : Traitements pour la co-culture des cellules N9 et des PC12.

2.9 Tests statistiques

Les photos de gels PCR furent acquises avec le logiciel AlphaEase FC et l'intensité des bandes fut analysée avec ce logiciel. L'écart-type sur la variation de l'intensité entre chacune des analyses a été réalisée. Les tests statistiques pour vérifier le niveau de signifiante des résultats furent réalisés par une analyse de variance à l'aide du logiciel GraphPad InStat.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Dose-réponse du MPP⁺ pour l'induction de l'apoptose sur les PC12

La figure 3.1 montre d'abord la dose réponse du MPP⁺ réalisée afin de déterminer sa dose optimale à utiliser pour induire l'apoptose des cellules PC12 différenciées. La dose de MPP⁺ utilisée antérieurement (5mM) (130) afin d'induire un stress oxydatif risquait d'être trop élevée et causer la nécrose (éclatement de la cellule) plutôt que l'apoptose. On peut constater à la figure 3.1 que la dose de MPP⁺ induisant environ 40% d'apoptose est de 100μM, c'est la dose qui sera utilisée pour les expériences sur l'apoptose, en accord aussi avec la littérature (184).

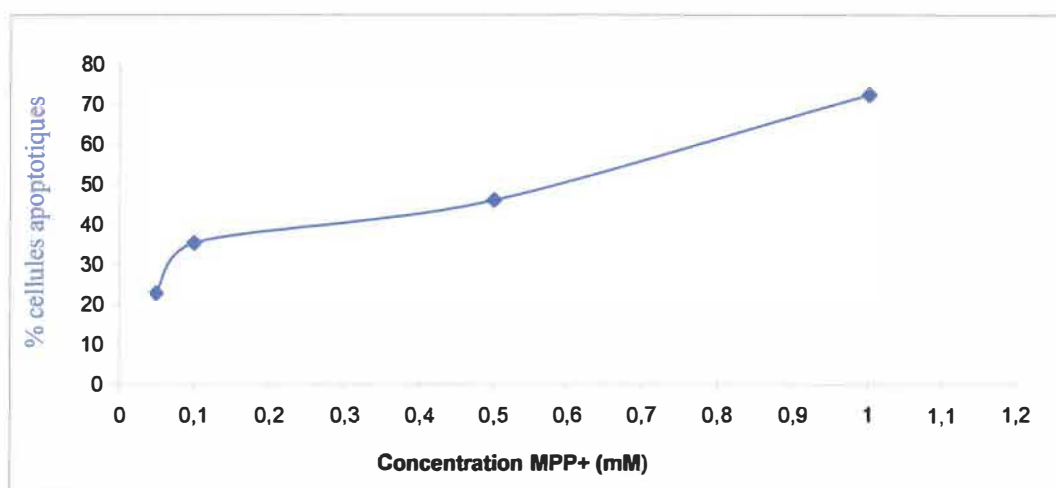


FIGURE 3.1 : Dose réponse du MPP⁺ pour l'induction de l'apoptose sur les cellules PC12. n=3

3.2 Effet du resvératrol et de la quercétine sur la mort cellulaire induite par le MPP⁺, sur les cellules PC12

Mes premières études ont démontré le pouvoir antioxydant de plusieurs phyto-estrogènes contre la toxicité du MPP⁺. La figure 3.2 présente les résultats obtenus par le dosage de la LDH, nous indiquant le niveau de mort cellulaire pour le traitement avec les phyto-estrogènes, resvératrol et quercétine. Suite au traitement avec un de ceux-ci et au MPP⁺, le surnageant a été prélevé afin de mesurer le niveau de LDH relâchée. Le

traitement des cellules PC12 différenciées avec seulement le MPP⁺ pour 24 heures cause 40% de mort cellulaire. Les surnageants des cellules qui ont subi seulement un traitement avec les phyto-estrogènes, sans le MPP⁺, n'ont pas montré une mort cellulaire importante, ce qui signifie que le resvératrol et la quercétine n'induisent pas la mort cellulaire d'eux-mêmes. Finalement, le pré-traitement des cellules PC12 avec le resvératrol préalablement au traitement au MPP⁺ réduit la mort cellulaire à 12%, alors que le pré-traitement avec la quercétine réduit la mort cellulaire induite par le MPP⁺ à 18%. Ceci signifie que le pré-traitement des cellules PC12 avec chacun des phyto-estrogènes étudiés permet de réduire significativement la mort cellulaire induite par le MPP⁺.

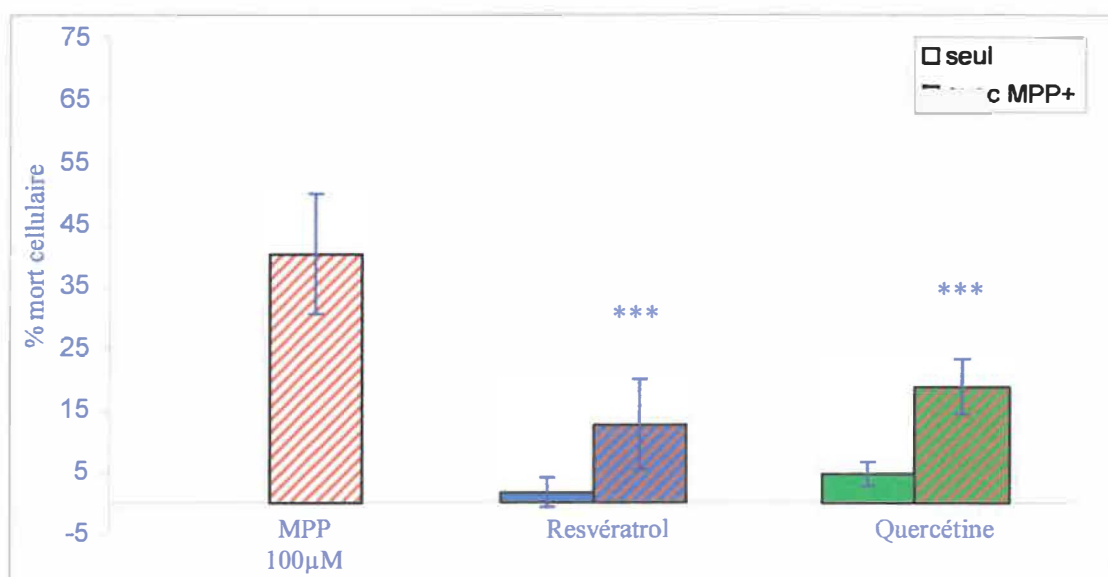


FIGURE 3.2 : Mesure de la mort cellulaire des cellules PC12.
Le resvératrol et la quercétine réduisent la mort cellulaire induite par le MPP⁺. *p<0,001 vs MPP⁺. N=3**

3.3 Effet du resvératrol et de la quercétine sur l'apoptose induite par le MPP⁺, sur les cellules PC12

Mon premier objectif de recherche était de vérifier si le resvératrol et la quercétine sont capables de réduire directement le niveau de mort apoptotique des cellules PC12. Les cellules ont subi d'abord un pré-traitement avec un des deux phyto-estrogènes, puis un traitement au MPP⁺ 100 µM pour induire l'apoptose. L'analyse des noyaux en apoptose s'est fait par le marquage au TUNEL. On peut avoir une appréciation visuelle des noyaux en apoptose (vert) et de tous les noyaux (bleu) à la figure 3.3. On peut constater

que les cellules seulement traitées au MPP^+ 100 μM sont majoritairement en apoptose. De plus, on peut dénoter une réduction du nombre de cellules en apoptose lorsque les cellules ont subi un pré-traitement avec un des deux phyto-estrogènes avant le MPP^+ . La figure 3.4 présente les résultats du décompte des noyaux en apoptose par rapport aux noyaux totaux. Le ratio de noyaux en apoptose pour les cellules traitées au MPP^+ est de 46%. Les cellules ayant subi un pré-traitement avec le resvératrol ou la quercétine avant le MPP^+ ont un ratio de noyaux en apoptose respectivement de 22% et 23%. On peut conclure que les phyto-estrogènes permettent de réduire la quantité de cellules en apoptose par rapport aux cellules traitées avec seulement l'inducteur d'apoptose, soit le MPP^+ .

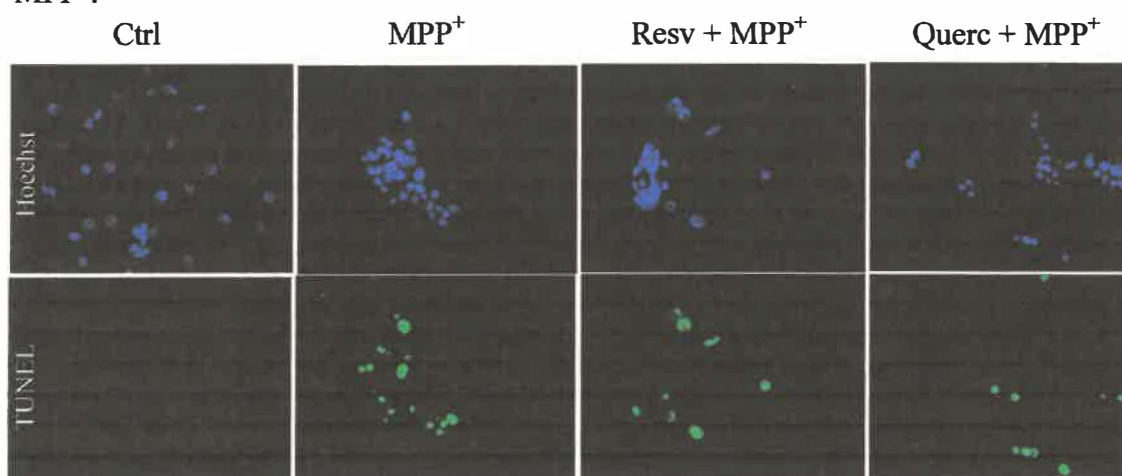


FIGURE 3.3 : Marquage au Hoechst (noyaux totaux) et au TUNEL (noyaux apoptose) des PC12. Réduction du nombre de noyaux en apoptose lors du traitement au resvératrol et à la quercétine avant le MPP^+ . Grossissement : 400X. n=2

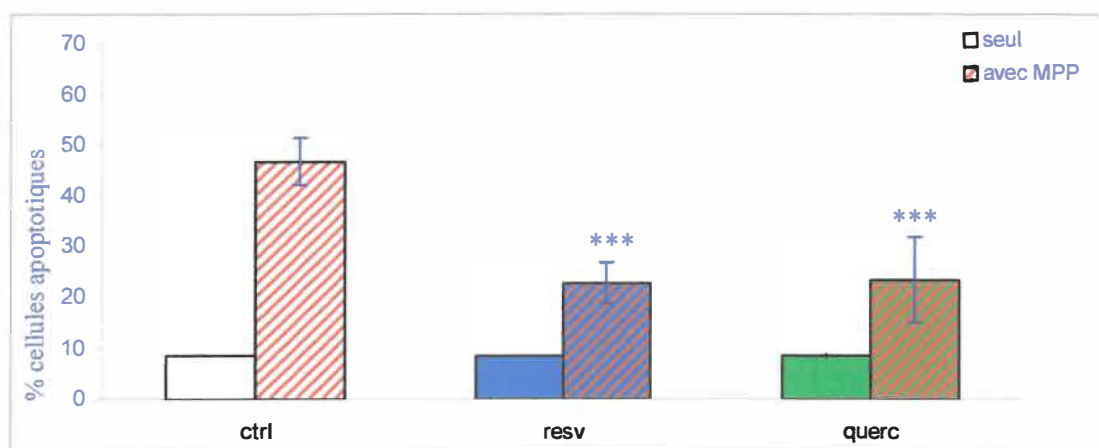


FIGURE 3.4 : Décompte des cellules en apoptose au TUNEL. Effet anti-apoptotique du resvératrol et de la quercétine sur les cellules PC12. *p<0,001 vs MPP^+ . N=2**

3.4 Dose-réponse de l'induction de l'inflammation par le LPS sur les cellules N9

Afin de déterminer la dose de LPS à utiliser pour induire l'activation des cellules N9, une dose réponse a été effectuée sur une période de traitement de 24 heures. Afin de vérifier le niveau d'inflammation pour chacune des concentrations testées, le niveau d'expression de deux cytokines pro-inflammatoires, le TNF- α et l'IL-1 α , a été étudié. La dose habituellement utilisée dans la littérature pour le LPS avec des cellules N9 est de 1 μ g/ml (168, 182). Cependant, les doses de 10 et 50 μ g/ml ont aussi été vérifiées. La figure 3.5 et 3.6 rapportent les résultats obtenus de l'expression de IL-1 α et de TNF- α respectivement suite au traitement des cellules N9 pour chacune des concentrations pour 24 heures. On note qu'à 1 μ g/ml, il y a une augmentation de 50% de l'expression de IL-1 α et de TNF- α par rapport au contrôle et leur niveau d'expression plafonne aux concentrations de 10 et 50 μ g/ml. Alors pour toutes les expériences sur l'inflammation, une dose de 1 μ g/ml de LPS sera utilisée pour 24 heures, ce qui est en accord avec la littérature.

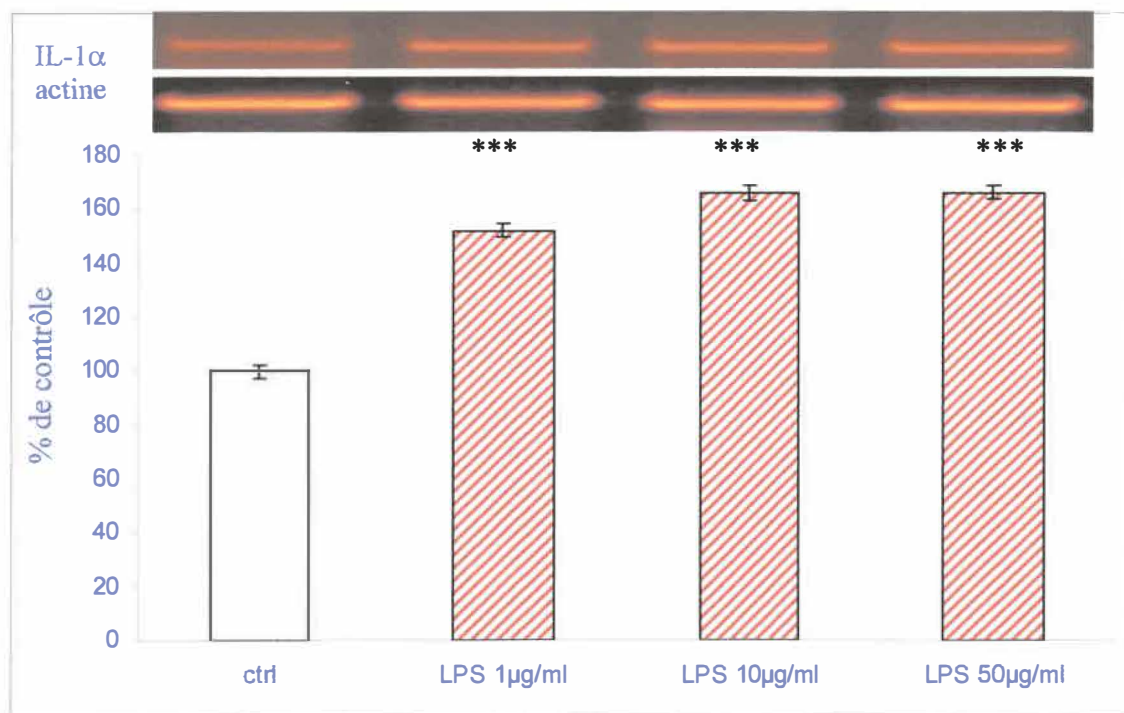


FIGURE 3.5 : Niveau d'expression de IL-1 α des cellules N9 suite au traitement à différentes concentrations de LPS. N=1, *p<0,01 vs ctrl**

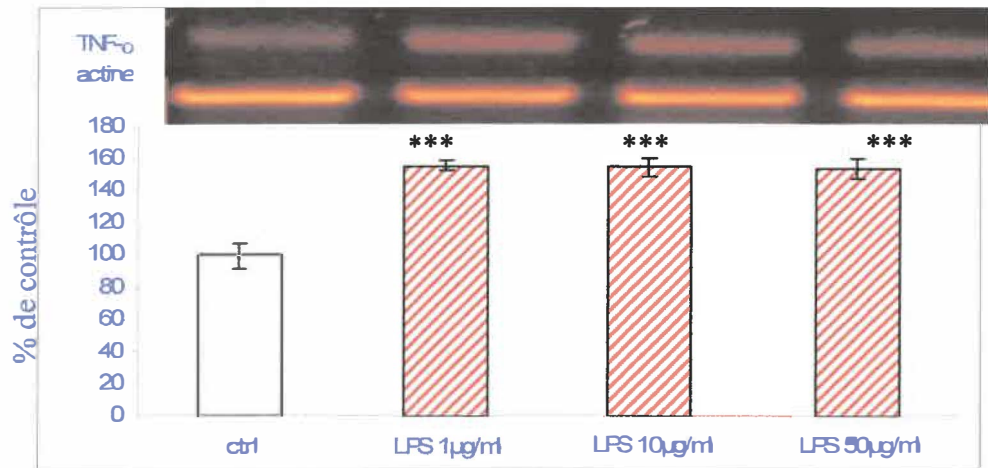


FIGURE 3.6 : Niveau d'expression de TNF- α des cellules N9 suite au traitement à différentes concentrations de LPS . n=1, *p<0,01 vs ctrl**

3.5 Effet du resvératrol et de la quercétine sur le niveau d'expression de IL-1 α et TNF- α activés par le LPS

Afin de vérifier le pouvoir anti-inflammatoire des deux phyto-estrogènes à l'étude, le niveau d'expression des deux marqueurs pro-inflammatoires utilisés a été mesuré suite aux différents traitements. Tout d'abord, le resvératrol et la quercétine ont été administrés sans pré-traitement, ce qui signifie que le LPS a été ajouté en même temps que les phyto-estrogènes. Les figures 3.7 et 3.8 présentent le niveau d'expression d'IL-1 α et TNF- α suite au traitement avec le resvératrol ou la quercétine sans pré-traitement. On peut constater que le traitement avec un des deux phyto-estrogènes sans qu'il y ait de pré-traitement est inefficace, puisqu'il n'y a pas de réduction du niveau d'inflammation.

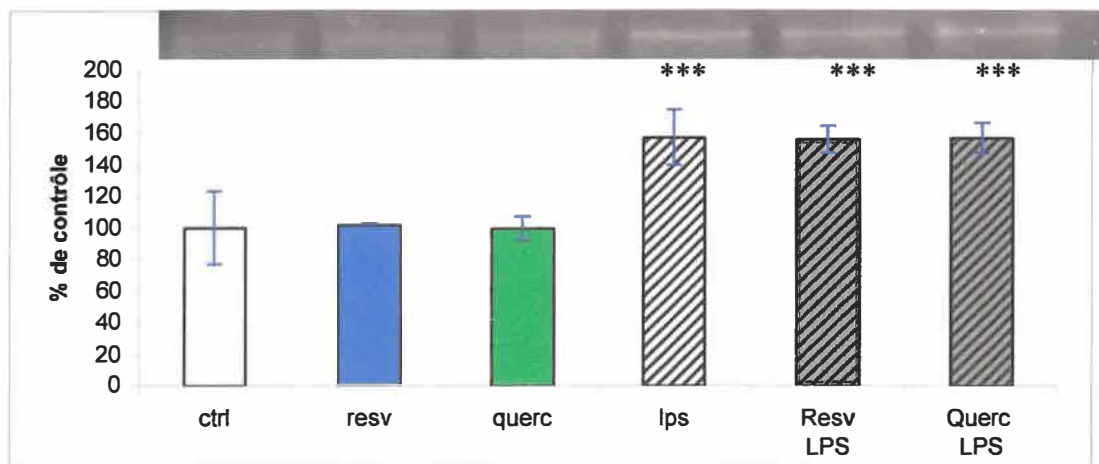


FIGURE 3.7 : Niveau d'expression d'IL- α suite au traitement des cellules N9 avec le resvératrol et la quercétine (sans pré-traitement). N=2, *p<0,01vs ctrl, resv ou quer**

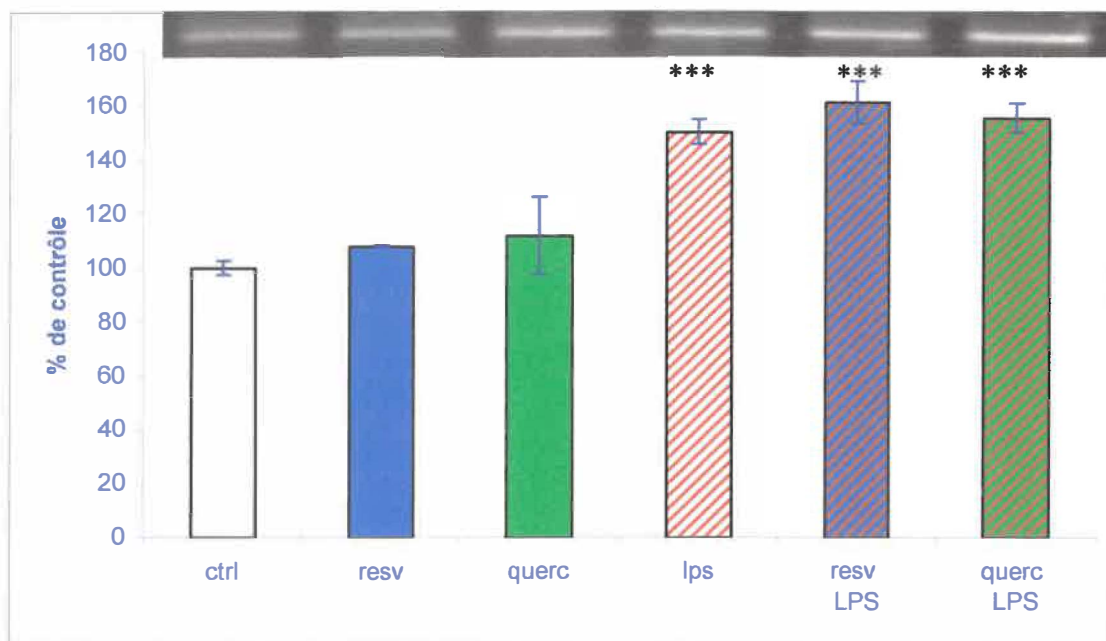


FIGURE 3.8 : Niveau d'expression de TNF- α suite au traitement des cellules N9 avec le resvératrol et la quercétine sans pré-traitement. N=2, *p<0,01vs ctrl, resv ou querc**

Ensuite, un pré-traitement de trois heures avec le resvératrol ou la quercétine a été réalisé pour vérifier leur pouvoir anti-inflammatoire. Les figures 3.9 et 3.10 présentent respectivement le niveau d'expression de l'IL-1 α et de TNF- α suite aux différents traitements. Tout d'abord, on peut constater que le niveau d'expression de l'IL-1- α est augmenté à 300% et TNF- α est augmenté à 400% lors du traitement des cellules microgliales avec seulement le LPS à comparer au contrôle. Les cellules seulement traitées au resvératrol ou à la quercétine ne démontrent pas de changement d'expression du niveau basal d'IL-1 α , ni de TNF- α , ce qui signifie que d'eux-mêmes les phyto-estrogènes n'induisent pas l'activation de la microglie. Enfin, les cellules qui ont subi un pré-traitement avec le resvératrol trois heures avant le traitement avec le LPS démontrent une réduction du niveau d'expression d'IL-1 α à 205%, alors que le TNF- α est diminué à 240%. Le pré-traitement à la quercétine permet, de son côté, de réduire le niveau d'expression d'IL-1 α à 226% et de TNF- α à 271%.

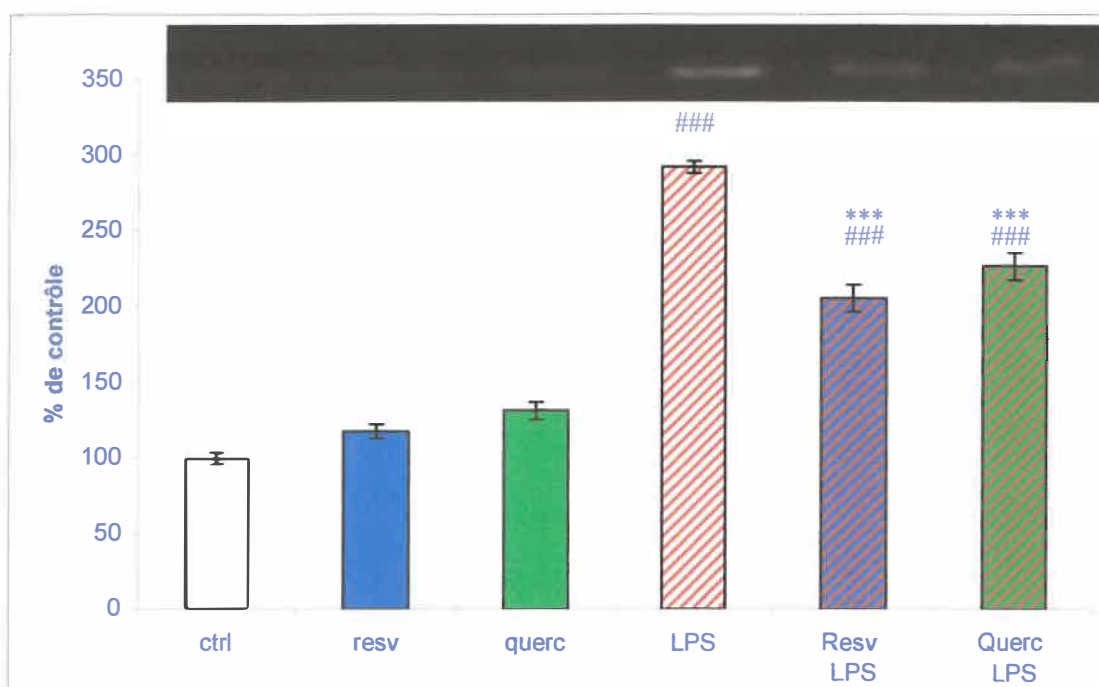


FIGURE 3.9 : Niveau d'expression de IL-1 α suite au pré-traitement aux phyto-estrogènes et au LPS des N9. * $p < 0,001$ vs LPS et ### $p < 0,01$ vs ctrl, resv ou querc. N=4**

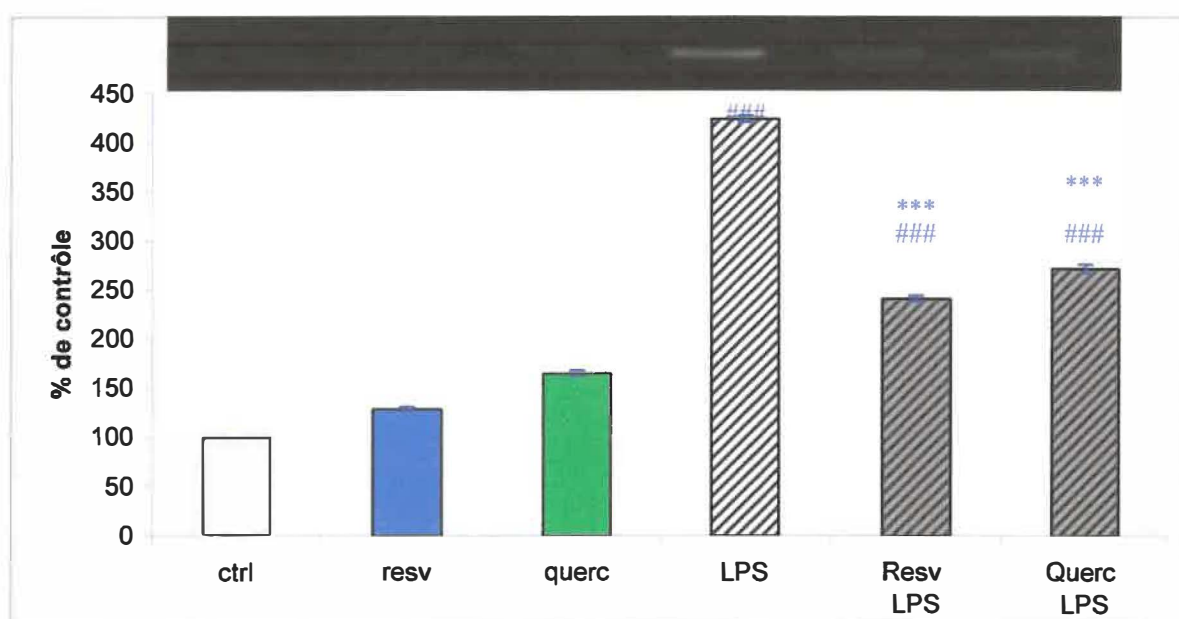


FIGURE 3.10 : Niveau d'expression de TNF- α suite au traitement aux phyto-estrogènes et au LPS des N9. * $p < 0,001$ vs LPS et ### $p < 0,01$ vs ctrl, resv ou querc. N=4**

3.6 Effet du LPS sur les cellules PC12 directement

Avant de réaliser les expériences de co-culture, on s'est d'abord assuré que le LPS ne causait pas directement de mort cellulaire sur les cellules PC12 puisque l'on veut étudier l'effet de l'inflammation et non d'une neurotoxicité directe. Pour ce faire, les cellules PC12 ont été traitées avec différentes concentrations de LPS pour 24 heures et le surnageant a été prélevé pour analyser le contenu en LDH. La figure 3.11 présente les résultats de mort cellulaire des PC12 lors du traitement avec le LPS pour 24 heures. On peut constater qu'aux différentes concentrations testées, soit 1, 10 et 50 $\mu\text{g/ml}$, on ne retrouve pas de mort cellulaire importante des PC12. Il était important qu'à 1 $\mu\text{g/ml}$, la concentration utilisée pour les expériences, le LPS ne cause pas de mort cellulaire des PC12.

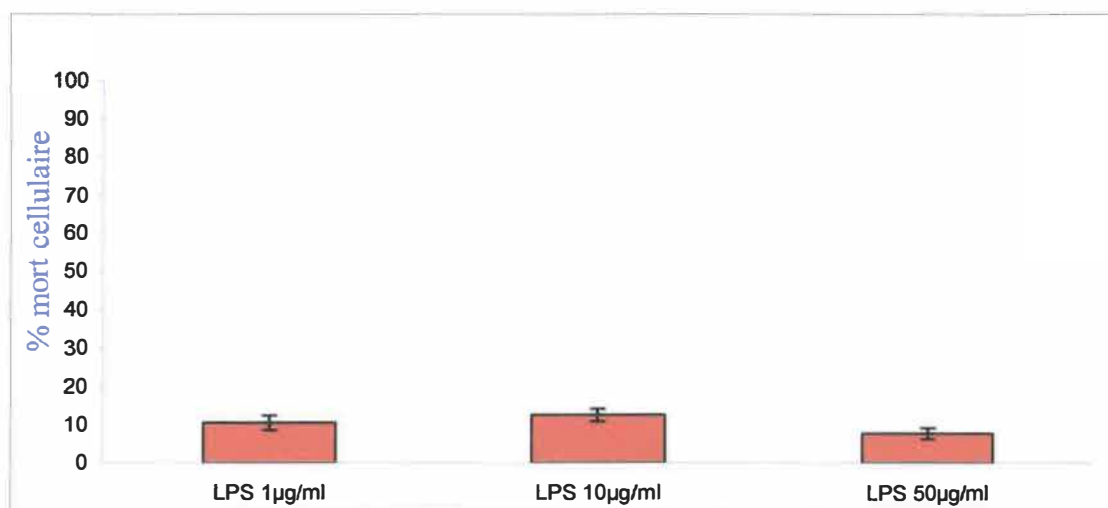


FIGURE 3.11: Mesure de la mort cellulaire par un dosage de LDH de cellules PC12.
Le LPS ne présente pas de neurotoxicité directe sur les cellules PC12. n=1

3.7 Effet de la microglie activée au LPS sur la mort cellulaire des PC12 dans un système de co-culture

Afin de reproduire le processus inflammatoire retrouvée dans la SNc dans la MP, un système de co-culture a été mis au point faisant intervenir la lignée de microglie N9 et les cellules PC12 qui représentent les neurones DAergiques. Tout d'abord, la microglie fut traitée au LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ pour 24 heures et ensuite transférée en présence de cellules

PC12 pour un 24 heures supplémentaire. Par la suite, le niveau de mort cellulaire des PC12 a été mesuré. La figure 3.12 présente les résultats du dosage de LDH dans le surnageant des cellules PC12 suite à la mise en contact avec les cellules microgliales activées au LPS. On constate que la mort cellulaire est faible pour les cellules PC12 qui ont été mis en contact avec des cellules microgliales non activées au LPS (condition contrôle). Lorsque la microglie est traitée au LPS, on constate qu'il y a une mort des cellules PC12 à près de 50%. Donc, l'activation de la microglie dans notre système de co-culture cause la mort des cellules PC12.

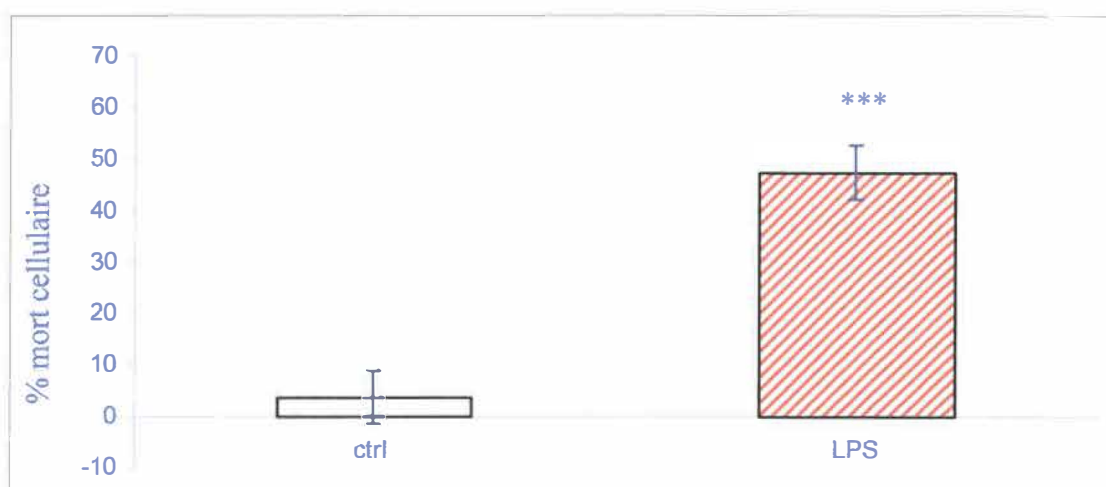


FIGURE 3.12 : Mesure de la mort cellulaire des cellules PC12 induite par la microglie activée au LPS. * $p < 0,001$ vs ctrl. N=3**

3.8 Effet de la microglie activée au LPS sur le processus d'apoptose des PC12

Étant donné que la microglie activée peut causer la mort cellulaire des PC12 et que le processus de mort apoptotique est impliquée dans la neurodégénération des neurones DAergiques dans la MP, on s'est intéressé à savoir si la microglie activée dans notre système de co-culture induit le processus de mort apoptotique sur les cellules PC12. La figure 3.13 montre le triple marquage des cellules PC12 mises en contact avec la microglie activée et non activée au LPS. Le marquage des noyaux en apoptose a été réalisé au TUNEL (vert) et de tous les noyaux au Hoechst (bleu). Afin de valider nos résultats de TUNEL pour le marquage d'apoptose, un second marqueur d'apoptose fut utilisé : la caspase-3 clivée. Son marquage a été réalisé avec un anticorps primaire spécifique à la caspase-3 clivée et un anticorps secondaire lié au fluorophore Cy3. On

peut constater qu'il n'y a pas de cellules PC12 en apoptose lorsqu'elles sont mises en contact avec la microglie non activée au LPS (condition contrôle). Le marquage TUNEL⁺ et la présence de caspase-3 activée est visible lorsque les cellules PC12 ont été mises en présence de cellules microgliales activées au LPS. On peut donc conclure que la mort des cellules PC12 médiée par la microglie active est un processus de mort apoptotique.

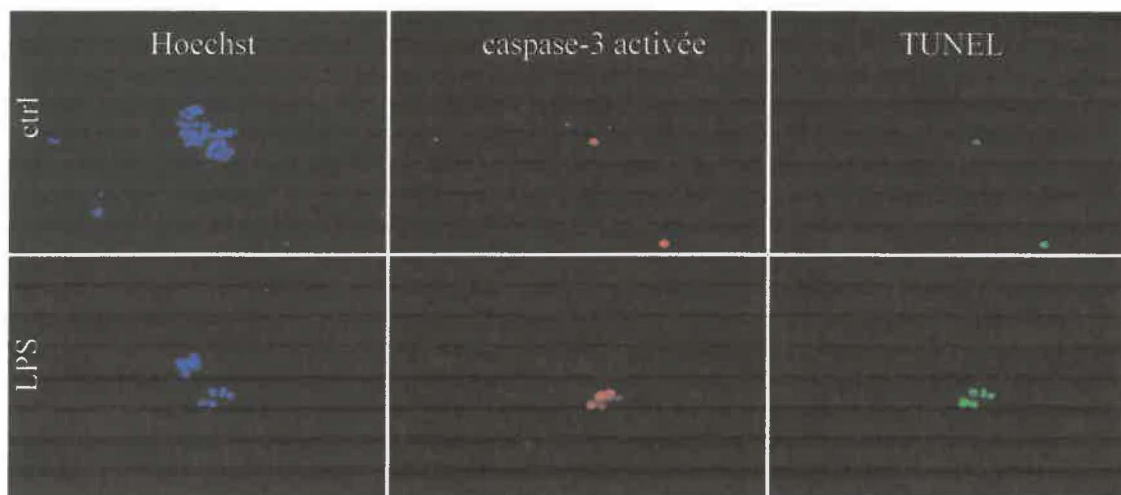


FIGURE 3.13 : Marquage des cellules en apoptose.
 Marquage au Hoechst (noyaux totaux), au TUNEL (noyaux apoptose) et de la caspase-3 activée (noyaux apoptose) des cellules PC12.
 Grossissement 400X. n=2

3.9 Effet du pré-traitement au resvératrol ou à la quercétine de la microglie activée au LPS sur la mort cellulaire des PC12 dans un système de co-culture

Le pouvoir anti-inflammatoire du resvératrol et de la quercétine a déjà été démontré par leur capacité à réduire le niveau d'expression de l'IL-1 α et de TNF- α de la microglie activée au LPS (voir figure 3.9 et 3.10). On s'est alors questionné à savoir si le pré-traitement des cellules N9 avec le resvératrol ou la quercétine avant le traitement au LPS permet de réduire le niveau de mort cellulaire des PC12 lorsqu'ils sont mises en contact entre elles. La figure 3.14 présente les résultats du dosage de LDH dans le surnageant des cellules PC12 suite à leur mise en contact avec la microglie activée ayant subi un pré-traitement avec le resvératrol ou la quercétine. Les PC12 mises en contact avec la microglie activée au LPS présente une mort cellulaire à 50%. Le pré-traitement des

cellules N9 au resvératrol ou la quercétine avant le traitement au LPS et le transfert avec les cellules PC12 permet de réduire la mort cellulaire des cellules PC12 à 24 et 25% respectivement. On peut donc conclure qu'une diminution de l'activation de la microglie par un pré-traitement avec un des deux phyto-estrogènes étudié permet de réduire la mort cellulaire des PC12.

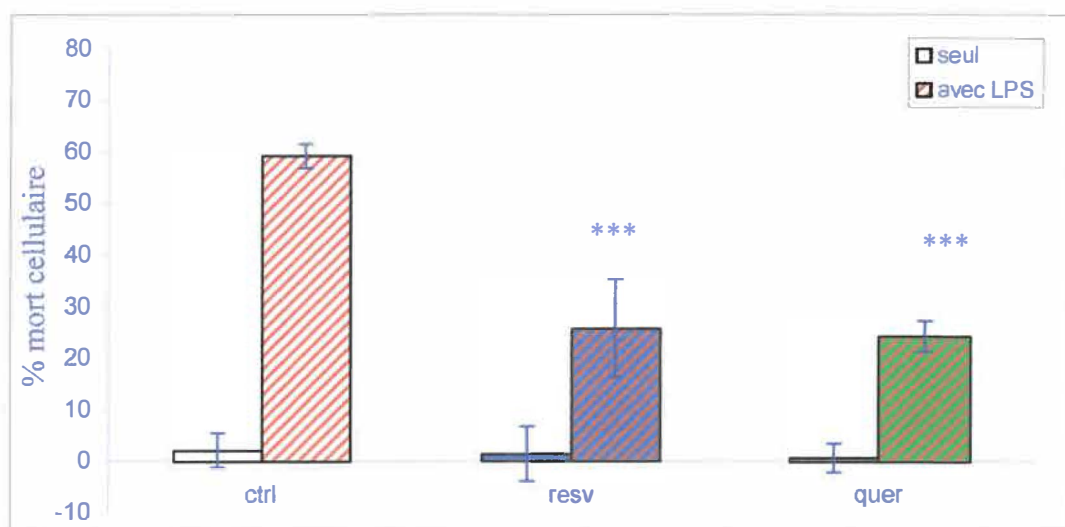


FIGURE 3.14 : Mesure de la mort cellulaire des cellules PC12 suite à la co-culture avec les N9. Le resvératrol et la quercétine réduisent la mort cellulaire des PC12 induite par les cellules N9 activées au LPS. * $p < 0,001$ vs LPS. N=3**

3.10 Effet du pré-traitement au resvératrol ou à la quercétine de la microglie activée au LPS sur l'apoptose des PC12 dans un système de co-culture

Aux sections précédentes, il a été montré que le resvératrol et la quercétine permettent de réduire l'activation de la microglie et le taux de mort cellulaire des cellules PC12 induite par la microglie activée au LPS. Il a été vérifié si le pré-traitement avec le resvératrol ou la quercétine de la microglie au LPS permettait de réduire la mort cellulaire des PC12. Pour ce faire, le marquage des noyaux avec DAPI et le marquage de la caspase-3 activée avec TUNEL ont été réalisés. La figure 3.15 présente des images de sections de cellules PC12 et le marquage au TUNEL (en vert) et au DAPI (en bleu). On

LDH/XTT
casp3+TUNEL
NEUN, TH1/DAPI
(4) 79912

peut constater une réduction du nombre de noyaux en apoptose des cellules PC12 qui ont été mises en contact avec les cellules N9 ayant subi un pré-traitement avec le resvératrol ou la quercétine comparativement avec les N9 traitées avec seulement le LPS (voir la figure 3.16).

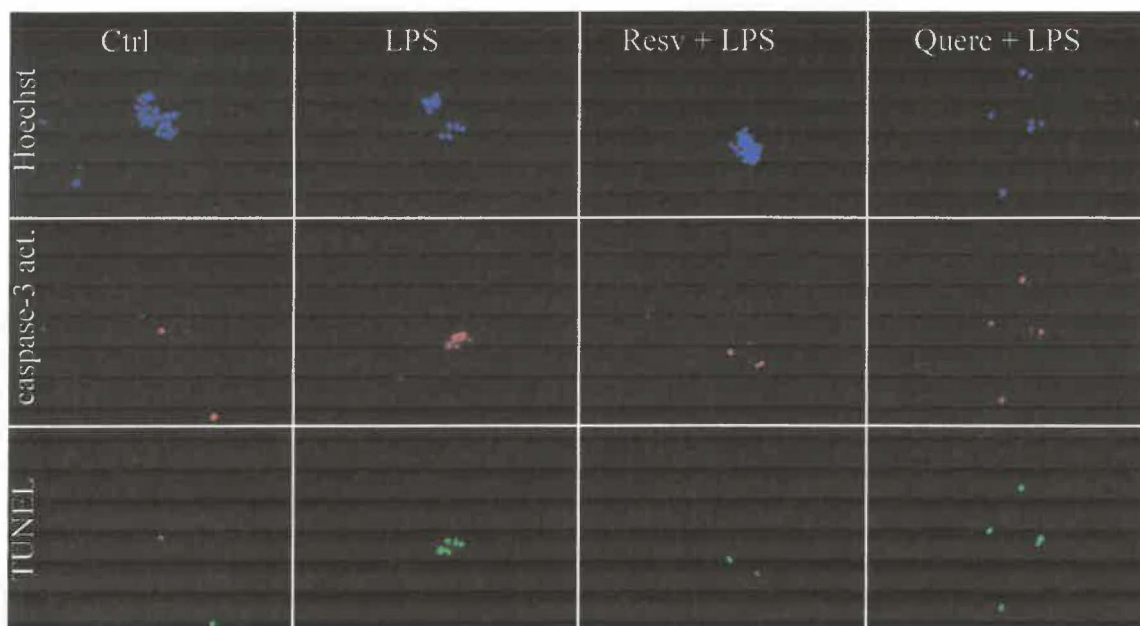


FIGURE 3.15 : Marquage au Hoechst (noyaux totaux), au TUNEL (noyaux apoptose) et de la caspase-3 activée (noyaux apoptose) des cellules PC12. Grossissement 400X. n=2

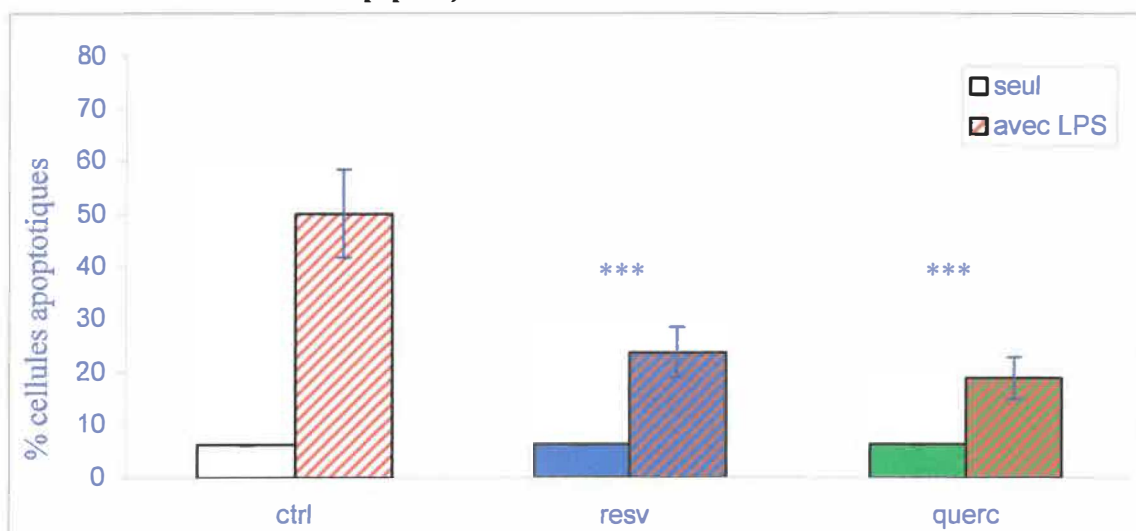


FIGURE 3.16 : Décompte des cellules PC12 en apoptose suite à leur mise en contact avec les cellules N9. L'effet anti-inflammatoire des deux phyto-estrogènes réduit le niveau de mort apoptotique induite par la microglie activée au LPS. *p<0,001 vs LPS.**

CHAPITRE 4

CONCLUSIONS

Mes travaux de recherche avaient deux objectifs de départ très distincts qui portaient sur le stress oxydatif et la neuroinflammation. Même s'ils semblent des sujets éloignés, ces deux phénomènes ont en commun qu'ils induisent l'apoptose des neurones DAergiques et contribuent au développement et à la progression de la MP.

Tout d'abord, je devais mettre en évidence qu'un stress oxydatif induit par le MPP⁺ sur des cellules PC12 initiait la mort de ces cellules par un processus d'apoptose. Le marquage au TUNEL des noyaux en apoptose nous a indiqué que près de 50% des cellules PC12 différenciées traitées au MPP⁺ sur une période de 24 heures étaient en apoptose comparativement à la condition contrôle non traitée. Ensuite, le pouvoir du resvératrol et de la quercétine à réduire le niveau de mort apoptotique induit par le MPP⁺ a été vérifié. Même si le pouvoir des deux phyto-estrogènes à réduire la mort cellulaire suite à un stress oxydatif a déjà été démontré par le passé, leur capacité à réduire la mort apoptotique de cellules neuronales restait à être démontré. On a découvert que le pré-traitement des cellules PC12 avec ces phyto-estrogènes avant l'ajout du MPP⁺ permet de réduire considérablement la quantité de noyaux en apoptose comparativement aux cellules seulement traitées au MPP⁺. Ceci a permis de conclure que le resvératrol et la quercétine permettent de réduire la mort apoptotique des cellules neuronales. Ceci pourrait signifier qu'une consommation quotidienne de ces phyto-estrogènes permettrait une prévention de l'initiation du processus d'apoptose des neurones DAergiques, ce qui réduirait l'incidence de l'apparition de la MP causée par le vieillissement.

D'un autre côté, je devais vérifier sur de la microglie en culture si les deux phyto-estrogènes d'intérêt possèdent des propriétés anti-inflammatoires. Tout d'abord, le processus d'initiation de l'inflammation avec le LPS sur des cellules de la microglie a été mis au point. Le LPS tend à augmenter considérablement le niveau d'expression des deux marqueurs pro-inflammatoires étudiés, l'IL-1 α et leTNF- α . Ensuite, il a été vérifié si l'ajout des phyto-estrogènes, sans pré-traitement, possèdent les propriétés de réduire le

niveau d'inflammation, c'est-à-dire de réduire le niveau d'IL-1 α et de TNF- α . Il en est ressorti que le niveau d'expression de IL-1 α et de TNF- α est le même lorsque les cellules étaient traitées avec le LPS que lorsqu'elles étaient traitées avec le resvératrol ou la quercétine et le LPS. D'un autre côté, la microglie a subi un pré-traitement avec le resvératrol ou la quercétine avant le traitement au LPS. Le niveau d'expression d'IL-1 α était alors réduit à 205% et 226% lorsque la microglie subissait un pré-traitement respectivement avec le resvératrol et la quercétine, alors que TNF- α était réduit à 240% et 271%. La microglie seulement traitée au LPS augmente le niveau d'expression de IL-1 α à 300% et de TNF- α à 400%. On peut donc d'abord conclure qu'un pré-traitement des cellules microgliales est essentiel afin d'observer un effet anti-inflammatoire. L'hypothèse soulevée pour expliquer ces résultats est que les phyto-estrogènes doivent d'abord être absorbés dans la cellule et doivent enclencher des voies de signalisation de survie et de protection cellulaire pour fournir un effet anti-inflammatoire. Ceci s'applique très bien à l'être humain qui consomme toute sa vie dans sa diète des éléments antioxydants et anti-inflammatoires qui s'accumulent dans les cellules et les préparent à se protéger contre un stress. On peut donc conclure que le resvératrol et la quercétine possèdent des propriétés anti-inflammatoires, puisqu'ils réduisent le niveau d'inflammation sur la microglie directement.

Une réaction inflammatoire dans le mésencéphale entraîne généralement une forte mort des neurones DAergiques et peut causer le développement de la MP lors d'une trop grande dégénérescence de ces neurones. Tout d'abord, il a été vérifié que la microglie activée au LPS peut induire la mort des cellules PC12. Dans un système de co-culture de microglie activée au LPS et de neurones PC12, on a remarqué que la microglie activée était capable d'induire la mort des neurones PC12 par un processus d'apoptose. On a donc vérifié si le pouvoir anti-inflammatoire du resvératrol et de la quercétine permet de réduire le niveau de mort cellulaire des PC12. Une diminution marquée du niveau de mort cellulaire des cellules PC12 (figure 3.14) et du niveau d'apoptose (figure 3.16) est observée lorsque la microglie subit un pré-traitement avec un des phyto-estrogènes avant le LPS. On peut donc conclure qu'en plus de posséder un pouvoir anti-inflammatoire, le resvératrol et la quercétine permettent de réduire le niveau de mort cellulaire apoptotique

induite par le processus inflammatoire de la microglie activée. Donc, selon le modèle utilisé, le resvératrol et la quercétine sont des molécules qui peuvent être classées comme molécules anti-apoptotiques et anti-inflammatoires.

À la lumière de tous ces résultats, on peut conclure que le stress oxydatif et la neuroinflammation sont deux phénomènes qui sont capables de causer la mort apoptotique des neurones PC12. Mes résultats sont en accord avec la littérature (100) puisque dans un premier temps, il est démontré que les neurones DAergiques du cerveau de patients atteints de la MP sont en grande majorité dans un stade intermédiaire ou avancé du processus d'apoptose (47). De plus, il est démontré que dans le cerveau de patients parkinsonniens, plusieurs marqueurs de stress oxydatif (37) et d'inflammation (91) sont augmentés. Ainsi, l'administration des phyto-estrogènes resvératrol et quercétine permet de réduire le niveau de mort apoptotique induite par le stress oxydatif et la neuroinflammation.

Il serait très intéressant de mesurer le niveau de production des protéines d'IL-1 α et de TNF- α , puisque seulement leur niveau d'expression de l'ARNm a été mesuré dans ma recherche. De plus, il serait important de pouvoir comprendre le mécanisme anti-inflammatoire et anti-apoptotique du resvératrol et de la quercétine. Par exemple, il serait intéressant de vérifier si ces phyto-estrogènes augmentent le niveau d'expression de certaines molécules anti-apoptotiques, telle que Bcl-2, ou diminuent l'expression de molécules pro-apoptotiques, comme Bax et p53. Ainsi, on pourrait savoir s'ils agissent au niveau transcriptionnel de certains gènes et voir leur effet au niveau de certaines voies pro-apoptotiques. De plus, il serait intéressant de savoir si les phyto-estrogènes étudiés agissent sur le facteur de transcription NF-kB. Ce facteur est un acteur central de plusieurs voies de signalisation cellulaire, dont l'inflammation. On pourrait donc en venir à comprendre les mécanismes de protection anti-inflammatoire du resvératrol et de la quercétine. De plus, le même type d'expérience pourrait être reproduit *in vivo* sur des souris, ainsi on pourrait mieux connaître l'effet des phyto-estrogènes lors d'interactions plus complexes entre les neurones et la microglie dans un cerveau.

Une alimentation quotidienne riche en resvératrol et en quercétine permettrait de réduire les marqueurs de stress oxydatif et d'inflammation dans le cerveau et préviendrait la mort apoptotique des neurones DAergiques. D'un autre point de vue, une thérapie riche en phyto-estrogènes pourrait être complémentaire à la dopathérapie et ainsi permettre un ralentissement de la progression de la maladie et améliorer la qualité de vie des patients. Le resvératrol et la quercétine sont deux molécules produites naturellement qui ont pour avantage de ne pas causer d'effets secondaires indésirables aux doses utilisées dans nos recherches. Leur utilisation semble très intéressante tant pour leur propriété d'antioxydants que pour leur pouvoir anti-inflammatoire. Même s'ils sont déjà reconnus pour leurs bienfaits contre les maladies cardiaques, ces deux phyto-estrogènes sont aussi à l'étude pour leur pouvoir anti-cancer.

Dans la société vieillissante d'aujourd'hui, il est important de se sensibiliser à une alimentation dans laquelle on peut rechercher certains « outils » pour combattre les effets du vieillissement et ainsi en venir à réduire les conséquences du vieillissement, comme les maladies neurodégénératives. Comme un vieux proverbe le cite : « Mieux vaut prévenir que guérir ».

11. Tolosa E, Wenning G, Poewe W. The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2006;5:75-86.
12. Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2000;62:63-88.
13. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 2003;39:889-909.
14. Walsh DM, Selkoe DJ. Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein Pept Lett.* 2004;11:213-228.
15. Trojanowski JQ, Lee VM. Phosphorylation of neuronal cytoskeletal proteins in Alzheimer's disease and Lewy body dementias. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;747:92-109.
16. Schreiner HJ. Melanin pigmentation of the substantia nigra in primates. *J Comp Neurol.* 1939;71:91.
17. Zecca L, Tampellini D, Gerlach M, Riederer P, Fariello RG, Sulzer D. Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. *Mol Pathol.* 2001;54:414-418.
18. D'Amato RJ, Lipman ZP, Snyder SH. Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP⁺ binds to neuromelanin. *Science.* 1986;231:987-989.
19. Vila M, Przedborski S. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat Med.* 2004;10 Suppl:S58-S62.
20. Bertram L, Tanzi RE. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest.* 2005;115:1449-1457.
21. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, et al. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet.* 2004;364:1167-1169.

BIBLIOGRAPHIE

1. Burch D, Sheerin F. Parkinson's disease. *Lancet*. 2005;365:622-627.
2. EHRINGER H, HORNYKIEWICZ O. [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system.]. *Klin Wochenschr*. 1960;38:1236-1239.
3. Roe DL. From DOPA to Parkinson's disease: the early history of dopamine research. *J Hist Neurosci*. 1997;6:291-301.
4. Kontakos N, Stokes J. Monograph series on aging-related diseases: XII. Parkinson's disease--recent developments and new directions. *Chronic Dis Can*. 1999;20:58-76.
5. Semchuk KM, Love EJ, Lee RG. Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology*. 1992;42:1328-1335.
6. Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Priyadarshi SS. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res*. 2001;86:122-127.
7. Wang SJ, Fuh JL, Teng EL, et al. A door-to-door survey of Parkinson's disease in a Chinese population in Kinmen. *Arch Neurol*. 1996;53:66-71.
8. Dluzen D, Horstink M. Estrogen as neuroprotectant of nigrostriatal dopaminergic system: laboratory and clinical studies. *Endocrine*. 2003;21:67-75.
9. Amantea D, Russo R, Bagetta G, Corasaniti MT. From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacol Res*. 2005;52:119-132.
10. Pollak P. *La Maladie de Parkinson*. France: 2004.

22. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*. 2003;302:841.
23. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997;276:2045-2047.
24. Forloni G, Bertani I, Calella AM, Thaler F, Invernizzi R. Alpha-synuclein and Parkinson's disease: selective neurodegenerative effect of alpha-synuclein fragment on dopaminergic neurons in vitro and in vivo. *Ann Neurol*. 2000;47:632-640.
25. Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, et al. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*. 2000;25:239-252.
26. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*. 2004;44:601-607.
27. Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S, et al. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet*. 1997;60:588-596.
28. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 1998;392:605-608.
29. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*. 2003;299:256-259.
30. bou-Sleiman PM, Healy DG, Quinn N, Lees AJ, Wood NW. The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2003;54:283-286.
31. Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Ariga SM, Takahashi K, Ariga H. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep*. 2004;5:213-218.

32. Valente EM, Salvi S, Ialongo T, et al. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol.* 2004;56:336-341.
33. Gutteridge JM. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun.* 1993;19:141-158.
34. Graham DG, Tiffany SM, Bell WR, Jr., Gutknecht WF. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Mol Pharmacol.* 1978;14:644-653.
35. Graham DG. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol.* 1978;14:633-643.
36. Hill JM, Switzer RC, III. The regional distribution and cellular localization of iron in the rat brain. *Neuroscience.* 1984;11:595-603.
37. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003;53 Suppl 3:S26-S36.
38. Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:2696-2701.
39. Zarkovic K. 4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med.* 2003;24:293-303.
40. Castellani RJ, Perry G, Siedlak SL, et al. Hydroxynonenal adducts indicate a role for lipid peroxidation in neocortical and brainstem Lewy bodies in humans. *Neurosci Lett.* 2002;319:25-28.
41. Zhang J, Perry G, Smith MA, et al. Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *Am J Pathol.* 1999;154:1423-1429.
42. Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, et al. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem.* 1997;69:1196-1203.

43. Alam ZI, Daniel SE, Lees AJ, Marsden DC, Jenner P, Halliwell B. A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *J Neurochem.* 1997;69:1326-1329.
44. Mochizuki H, Goto K, Mori H, Mizuno Y. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 1996;137:120-123.
45. Ferri KF, Kroemer G. Mitochondria--the suicide organelles. *Bioessays.* 2001;23:111-115.
46. Hartmann A, Hunot S, Michel PP, et al. Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:2875-2880.
47. Hirsch EC, Hunot S, Faucheux B, et al. Dopaminergic neurons degenerate by apoptosis in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 1999;14:383-385.
48. Vila M, Przedborski S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4:365-375.
49. Matés JM, Pérez-Gomez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry.* 1999;32:595-603.
50. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 2002;18:872-879.
51. Ben-Shachar D, Riederer P, Youdim MB. Iron-melanin interaction and lipid peroxidation: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1991;57:1609-1614.
52. Dexter DT, Wells FR, Lees AJ, et al. Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1989;52:1830-1836.
53. Sofic E, Riederer P, Heinsen H, et al. Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J Neural Transm.* 1988;74:199-205.

54. Harley A, Cooper JM, Schapira AH. Iron induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction: relevance to Parkinson's disease. *Brain Res.* 1993;627:349-353.
55. Sengstock GJ, Olanow CW, Dunn AJ, Barone S Jr, Arendash GW. Progressive changes in striatal dopaminergic markers, nigral volume, and rotational behavior following iron infusion into the rat substantia nigra. *Exp Neurol.* 1994;130:82-94.
56. Velez-Pardo C, Jimenez Del RM, Verschueren H, Ebinger G, Vauquelin G. Dopamine and iron induce apoptosis in PC12 cells. *Pharmacol Toxicol.* 1997;80:76-84.
57. Nicklas WJ, Youngster SK, Kindt MV, Heikkila RE. MPTP, MPP+ and mitochondrial function. *Life Sci.* 1987;40:721-729.
58. Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, Herkenham MA. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature.* 1984;311:464-467.
59. Bezard E, Gross CE, Fournier MC, Dovero S, Bloch B, Jaber M. Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. *Exp Neurol.* 1999;155:268-273.
60. Przedborski S, Tieu K, Perier C, Vila M. MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr.* 2004;36:375-379.
61. Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 2004;318:215-224.
62. Mizuno Y, Saitoh T, Sone N. Inhibition of mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;143:971-976.
63. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1990;54:823-827.

64. Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, et al. Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;163:1450-1455.
65. Greenamyre JT, Sherer TB, Betarbet R, Panov AV. Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life.* 2001;52:135-141.
66. Hattori N, Tanaka M, Ozawa T, Mizuno Y. Immunohistochemical studies on complexes I, II, III, and IV of mitochondria in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1991;30:563-571.
67. Mizuno Y, Matuda S, Yoshino H, Mori H, Hattori N, Ikebe S. An immunohistochemical study on alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1994;35:204-210.
68. Gu M, Cooper JM, Taanman JW, Schapira AH. Mitochondrial DNA transmission of the mitochondrial defect in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1998;44:177-186.
69. Lindau-Shepard BA, Shaffer JB. Expression of human catalase in acatalasemic murine SV-B2 cells confers protection from oxidative damage. *Free Radic Biol Med.* 1993;15:581-588.
70. Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J Biol Chem.* 2004;279:32804-32812.
71. Thiruchelvam M, Prokopenko O, Cory-Slechta DA, Richfield EK, Buckley B, Mirochnitchenko O. Overexpression of superoxide dismutase or glutathione peroxidase protects against the paraquat + maneb-induced Parkinson disease phenotype. *J Biol Chem.* 2005;280:22530-22539.
72. Kunikowska G, Jenner P. Alterations in m-RNA expression for Cu,Zn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the basal ganglia of MPTP-treated marmosets and patients with Parkinson's disease. *Brain Res.* 2003;968:206-218.
73. Bowling AC, Beal MF. Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci.* 1995;56:1151-1171.

74. Sian J, Dexter DT, Lees AJ, et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol.* 1994;36:348-355.
75. Sofic E, Lange KW, Jellinger K, Riederer P. Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 1992;142:128-130.
76. McGeer PL, Yasojima K, McGeer EG. Inflammation in Parkinson's disease. *Adv Neurol.* 2001;86:83-89.
77. Hald A, Lotharius J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exp Neurol.* 2005;193:279-290.
78. Liu B, Gao HM, Hong JS. Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation. *Environ Health Perspect.* 2003;111:1065-1073.
79. Cuadros MA, Navascues J. The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol.* 1998;56:173-189.
80. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 1996;19:312-318.
81. Aloisi F. The role of microglia and astrocytes in CNS immune surveillance and immunopathology. *adv exp med biol.* 1999;468:123-133.
82. Diedrich J, Wietgreffe S, Zupancic M, et al. The molecular pathogenesis of astrogliosis in scrapie and Alzheimer's disease. *Microb Pathog.* 1987;2:435-442.
83. Hunot S, Boissiere F, Faucheux B, et al. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience.* 1996;72:355-363.
84. Hoozemans JJ, Veerhuis R, Janssen I, van Elk EJ, Rozemuller AJ, Eikelenboom P. The role of cyclo-oxygenase 1 and 2 activity in prostaglandin E(2) secretion by cultured human adult microglia: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2002;951:218-226.

85. Hunot S, Dugas N, Faucheux B, et al. FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci*. 1999;19:3440-3447.
86. Baeuerle PA. Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF-kappaB puzzle? *Curr Biol*. 1998;8:R19-R22.
87. Teismann P, Tieu K, Cohen O, et al. Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2003;18:121-129.
88. Batchelor PE, Liberatore GT, Wong JY, et al. Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*. 1999;19:1708-1716.
89. Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, et al. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature*. 1996;380:252-255.
90. Hirsch EC, Hunot S, Damier P, et al. Glial cell participation in the degeneration of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Adv Neurol*. 1999;80:9-18.
91. McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*. 1988;38:1285-1291.
92. Mogi M, Harada M, Kondo T, et al. Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci Lett*. 1994;180:147-150.
93. Blum-Degen D, Muller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett*. 1995;202:17-20.
94. Mogi M, Harada M, Kondo T, Narabayashi H, Riederer P, Nagatsu T. Transforming growth factor-beta 1 levels are elevated in the striatum and in ventricular cerebrospinal fluid in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 1995;193:129-132.

95. Chen H, Zhang SM, Hernan MA, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch Neurol*. 2003;60:1059-1064.
96. Feng ZH, Wang TG, Li DD, et al. Cyclooxygenase-2-deficient mice are resistant to 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced damage of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Neurosci Lett*. 2002;329:354-358.
97. Hu S, Peterson PK, Chao CC. Cytokine-mediated neuronal apoptosis. *Neurochem Int*. 1997;30:427-431.
98. McGuire SO, Ling ZD, Lipton JW, Sortwell CE, Collier TJ, Carvey PM. Tumor necrosis factor alpha is toxic to embryonic mesencephalic dopamine neurons. *Exp Neurol*. 2001;169:219-230.
99. Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol*. 1992;149:2736-2741.
100. Wang X, Chen S, Ma G, Ye M, Lu G. Involvement of proinflammatory factors, apoptosis, caspase-3 activation and Ca²⁺ disturbance in microglia activation-mediated dopaminergic cell degeneration. *Mech Ageing Dev*. 2005;126:1241-1254.
101. Kim YS, Kim SS, Cho JJ, et al. Matrix metalloproteinase-3: a novel signaling proteinase from apoptotic neuronal cells that activates microglia. *J Neurosci*. 2005;25:3701-3711.
102. Bronstein DM, Perez-Otano I, Sun V, et al. Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures. *Brain Res*. 1995;704:112-116.
103. Liu B, Hong JS. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;304:1-7.
104. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990;249:1431-1433.

105. **Herrera AJ, Castano A, Venero JL, Cano J, Machado A.** The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiol Dis.* 2000;7:429-447.
106. **Arai H, Furuya T, Yasuda T, Miura M, Mizuno Y, Mochizuki H.** Neurotoxic effects of lipopolysaccharide on nigral dopaminergic neurons are mediated by microglial activation, interleukin-1 β , and expression of caspase-11 in mice. *J Biol Chem.* 2004;279:51647-51653.
107. **Kohutnicka M, Lewandowska E, Kurkowska-Jastrzebska I, Czlonkowski A, Czlonkowska A.** Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Immunopharmacology.* 1998;39:167-180.
108. **Kurkowska-Jastrzebska I, Wronska A, Kohutnicka M, Czlonkowski A, Czlonkowska A.** The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp Neurol.* 1999;156:50-61.
109. **Mogi M, Togari A, Ogawa M, et al.** Effects of repeated systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to mice on interleukin-1 β and nerve growth factor in the striatum. *Neurosci Lett.* 1998;250:25-28.
110. **Canudas AM, Friguls B, Planas AM, et al.** MPP(+) injection into rat substantia nigra causes secondary glial activation but not cell death in the ipsilateral striatum. *Neurobiol Dis.* 2000;7:343-361.
111. **Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT.** Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2000;3:1301-1306.
112. **Gao HM, Jiang J, Wilson B, Zhang W, Hong JS, Liu B.** Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2002;81:1285-1297.
113. **COOPER IS.** Ligation of the anterior choroidal artery for involuntary movements; parkinsonism. *Psychiatr Q.* 1953;27:317-319.

114. SVENNILSON E, TORVIK A, LOWE R, LEKSELL L. Treatment of parkinsonism by stereotatic thermolesions in the pallidal region. A clinical evaluation of 81 cases. *Acta Psychiatr Scand.* 1960;35:358-377.
115. Crossman AR. Neural mechanisms in disorders of movement. *Comp Biochem Physiol A.* 1989;93:141-149.
116. Kelly PJ, Ahlskog JE, Goerss SJ, Daube JR, Duffy JR, Kall BA. Computer-assisted stereotactic ventralis lateralis thalamotomy with microelectrode recording control in patients with Parkinson's disease. *Mayo Clin Proc.* 1987;62:655-664.
117. Benabid AL, Pollak P, Louveau A, Henry S, de RJ. Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Appl Neurophysiol.* 1987;50:344-346.
118. Birkmayer W, HORNYKIEWICZ O. The effect of l-3,4-dihydroxyphenylalanine (= DOPA) on akinesia in parkinsonism. 1961. *Wien Klin Wochenschr.* 2001;113:851-854.
119. Chiasson K, Lahaie-Collins V, Bournival J, Delapierre B, Gelinas S, Martinoli MG. Oxidative stress, 17b- and 17a-estradiol modulate different neurofilaments. *J Molec Neurosci.* 2006;in press.
120. Béliveau R, Gingras G. *Les aliments contre le cancer.* Trécarré; 2005.
121. Currie LJ, Harrison MB, Trugman JM, Bennett JP, Wooten GF. Postmenopausal estrogen use affects risk for Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2004;61:886-888.
122. Paganini-Hill A, Henderson VW. Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *Am J Epidemiol.* 1994;140:256-261.
123. Paganini-Hill A. Estrogen replacement therapy and stroke. *Prog Cardiovasc Dis.* 1995;38:223-242.
124. Gollapudi L, Oblinger MM. Stable transfection of PC12 cells with estrogen receptor (ERalpha): protective effects of estrogen on cell survival after serum deprivation. *J Neurosci Res.* 1999;56:99-108.

125. Dubal DB, Zhu H, Yu J, et al. Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:1952-1957.
126. Zhao L, Wu TW, Brinton RD. Estrogen receptor subtypes alpha and beta contribute to neuroprotection and increased Bcl-2 expression in primary hippocampal neurons. *Brain Res*. 2004;1010:22-34.
127. Singer CA, Rogers KL, Strickland TM, Dorsa DM. Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neurosci Lett*. 1996;212:13-16.
128. Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor RH, Dorsa DM. The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci*. 1999;19:2455-2463.
129. Moosmann B, Behl C. The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:8867-8872.
130. Gelinas S, Martinoli MG. Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP⁺-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells. *J Neurosci Res*. 2002;70:90-96.
131. Gelinas S, Bureau G, Valastro B, et al. Alpha and beta estradiol protect neuronal but not native PC12 cells from paraquat-induced oxidative stress. *Neurotox Res*. 2004;6:141-148.
132. Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Akaike A, Shimohama S. Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal death. *J Neurosci Res*. 1998;54:707-719.
133. Gridley KE, Green PS, Simpkins JW. Low concentrations of estradiol reduce beta-amyloid (25-35)-induced toxicity, lipid peroxidation and glucose utilization in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *Brain Res*. 1997;778:158-165.
134. Sawada H, Ibi M, Kihara T, et al. Mechanisms of antiapoptotic effects of estrogens in nigral dopaminergic neurons. *FASEB J*. 2000;14:1202-1214.

135. Singer CA, Rogers KL, Dorsa DM. Modulation of Bcl-2 expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons. *Neuroreport*. 1998;9:2565-2568.
136. Garcia-Segura LM, Cardona-Gomez P, Naftolin F, Chowen JA. Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. *Neuroreport*. 1998;9:593-597.
137. Gollapudi L, Oblinger MM. Estrogen and NGF synergistically protect terminally differentiated, ERalpha-transfected PC12 cells from apoptosis. *J Neurosci Res*. 1999;56:471-481.
138. Sribnick EA, Ray SK, Nowak MW, Li L, Banik NL. 17beta-estradiol attenuates glutamate-induced apoptosis and preserves electrophysiologic function in primary cortical neurons. *J Neurosci Res*. 2004;76:688-696.
139. Singh M. Ovarian hormones elicit phosphorylation of Akt and extracellular-signal regulated kinase in explants of the cerebral cortex. *Endocrine*. 2001;14:407-415.
140. Morale MC, Serra PA, L'episcopo F, et al. Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience*. 2005.
141. Liao SL, Chen WY, Chen CJ. Estrogen attenuates tumor necrosis factor-alpha expression to provide ischemic neuroprotection in female rats. *Neurosci Lett*. 2002;330:159-162.
142. Bruce-Keller AJ, Keeling JL, Keller JN, Huang FF, Camondola S, Mattson MP. Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology*. 2000;141:3646-3656.
143. Vegeto E, Bonincontro C, Pollio G, et al. Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. *J Neurosci*. 2001;21:1809-1818.
144. Vegeto E, Belcredito S, Etteri S, et al. Estrogen receptor-alpha mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:9614-9619.

145. Purdie DW. Consequences of long-term hormone replacement therapy. *Br Med Bull.* 2000;56:809-823.
146. Collins JA, Blake JM, Crosignani PG. Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment. *Hum Reprod Update.* 2005;11:545-560.
147. Song RX, Zhang Z, Santen RJ. Estrogen rapid action via protein complex formation involving ERalpha and Src. *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16:347-353.
148. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem.* 1997;30:91-113.
149. Siemann EH, Creasy LL. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am J Enol Vitic.* 1992;43:49-52.
150. Jeandet P, Bessis R, Gautheron B. The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *Am J Enol Viti.* 1991;42:41.
151. Goldberg D.M., Yan J, Ng E, et al. A global survey of trans-resveratrol concentrations in commercial wines. *Am J Enol Vitic.* 1995;46:159-165.
152. Romero-Perez A.I., Lamuelaraventos R.M., Waterhouse A.L., Delatorreboronat M.C. Levels of cis- and trans-resveratrol and their glucosides in white and rose *Vitis vinifera* wine from Spain. *J Agric Food Chem.* 1996;44:2124-2128.
153. Dong Z. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutat Res.* 2003;523-524:145-150.
154. de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49:405-430.
155. Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, Klinge CM. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 2000;141:3657-3667.

156. Belguendouz L, Fremont L, Linard A. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochem Pharmacol.* 1997;53:1347-1355.
157. Bertelli AA, Giovannini L, Giannessi D, et al. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int J Tissue React.* 1995;17:1-3.
158. Das DK, Sato M, Ray PS, et al. Cardioprotection of red wine: role of polyphenolic antioxidants. *Drugs Exp Clin Res.* 1999;25:115-120.
159. Clement MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, Pervaiz S. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood.* 1998;92:996-1002.
160. Hsieh TC, Wu JM. Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Exp Cell Res.* 1999;249:109-115.
161. Szende B, Tyihak E, Kiraly-Veghely Z. Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. *Exp Mol Med.* 2000;32:88-92.
162. Huang C, Ma WY, Goranson A, Dong Z. Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Carcinogenesis.* 1999;20:237-242.
163. Mercer LD, Kelly BL, Horne MK, Beart PM. Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. *Biochem Pharmacol.* 2005;69:339-345.
164. Chen CY, Jang JH, Li MH, Surh YJ. Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331:993-1000.
165. Zhuang H, Kim YS, Koehler RC, Dore S. Potential mechanism by which resveratrol, a red wine constituent, protects neurons. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;993:276-286.

166. Jang JH, Surh YJ. Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Mutat Res.* 2001;496:181-190.
167. Takada Y, Bhardwaj A, Potdar P, Aggarwal BB. Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF-kappaB activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. *Oncogene.* 2004;23:9247-9258.
168. Bi XL, Yang JY, Dong YX, et al. Resveratrol inhibits nitric oxide and TNF-alpha production by lipopolysaccharide-activated microglia. *Int Immunopharmacol.* 2005;5:185-193.
169. Pervaiz S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J.* 2003;17:1975-1985.
170. Ignatowicz E, Baer-Dubowska W. Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases. *Pol J Pharmacol.* 2001;53:557-569.
171. Lin JK, Tsai SH. Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol. *Proc Natl Sci Counc Repub China B.* 1999;23:99-106.
172. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:19-34.
173. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* 1995;33:1061-1080.
174. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 1996;20:933-956.
175. Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans CA. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J.* 1998;330 (Pt 3):1173-1178.
176. Terao J, Piskula MK. Flavonoids and membrane lipid peroxidation inhibition. *Nutrition.* 1999;15:790-791.

177. Casagrande F, Darbon JM. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol.* 2001;61:1205-1215.
178. Rao YK, Fang SH, Tzeng YM. Inhibitory effects of the flavonoids isolated from *Waltheria indica* on the production of NO, TNF-alpha and IL-12 in activated macrophages. *Biol Pharm Bull.* 2005;28:912-915.
179. Greene LA. Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. *J Cell Biol.* 1978;78:747-755.
180. Parysek LM, Goldman RD. Characterization of intermediate filaments in PC12 cells. *J Neurosci.* 1987;7:781-791.
181. Dimayuga FO, Reed JL, Carnero GA, et al. Estrogen and brain inflammation: effects on microglial expression of MHC, costimulatory molecules and cytokines. *J Neuroimmunol.* 2005;161:123-136.
182. Li Y, Liu L, Barger SW, Mrak RE, Griffin WS. Vitamin E suppression of microglial activation is neuroprotective. *J Neurosci Res.* 2001;66:163-170.
183. Lee H, Kim YO, Kim H, et al. Flavonoid wogonin from medicinal herb is neuroprotective by inhibiting inflammatory activation of microglia. *FASEB J.* 2003;17:1943-1944.
184. Viswanath V, Wu Y, Boonplueang R, et al. Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2001;21:9519-9528.