

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
JULIE CARANGE

RÔLE ANTIOXYDANT ET ANTI-APOPTOTIQUE DES BRASSINOSTÉROÏDES,
UNE NOUVELLE STRATÉGIE DE NEUROPROTECTION ?

SEPTEMBRE 2010

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Comme avant-propos à ce mémoire, j'aimerais exprimer mes remerciements les plus sincères aux personnes qui ont contribué à l'élaboration de mon projet de recherche et plus particulièrement à mes proches qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de ma maîtrise en biophysique et biologie cellulaires.

Tout d'abord, je désire remercier Dr Maria-Grazia Martinoli, directrice du laboratoire de recherche en neurobiologie cellulaire, pour m'avoir donné la chance d'effectuer mes travaux de recherche dans son laboratoire. Je vous remercie pour tout le temps et l'aide que vous m'avez consacré et plus particulièrement pour la confiance et la liberté que vous m'avez accordées dans la gestion de mon projet de recherche. Votre soutien et votre persévérance m'ont permis de relever de nombreux défis.

Je tiens également à remercier l'équipe du laboratoire de recherche en neurobiologie cellulaire pour votre énergie, votre soutien et pour le partage de vos connaissances : Fanny Longpré, Marilyn Plouffe, Julie Bournival, Cindy Tremblay, Vicky Lahaie-Collins, Cindy Provencher et Judith Nodem Nguejo. Finalement, je remercie Marie-Eve Laramée et David Joly pour leur amitié ainsi que leur aide technique.

«L'art de la réussite consiste à savoir s'entourer des meilleurs»
John F. Kennedy (1916-1963)

RÉSUMÉ

La maladie de Parkinson est une affection neurodégénérative qui affecte la coordination et la motricité volontaire. Cette maladie est caractérisée par un déficit en dopamine qui découle de la destruction de neurones dopaminergiques dans la substance noire du mésencéphale. Plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'expliquer la destruction de ces neurones et le stress oxydant semble être un facteur fréquemment évoqué. Le stress oxydant résulte d'une surproduction d'oxydants qui excède le potentiel antioxydant de la cellule et cette accumulation provoquerait la mort des cellules par apoptose. Mon projet de recherche se concentre sur l'étude du potentiel neuroprotecteur des brassinostéroïdes, des phytostérols beaucoup étudiés pour leurs rôles dans le métabolisme des plantes, notamment pour leurs effets protecteurs contre les différents stress environnementaux. Le brassinostéroïde analysé dans mon travail de recherche est le 24-épibrassinolide, un composé présent dans la gourgane. Cette fève est d'ailleurs utilisée dans des projets de recherche clinique comme traitement symptomatique de la maladie de Parkinson. L'objectif principal de mon projet de recherche était d'étudier le potentiel antioxydant et anti-apoptotique du 24-épibrassinolide et son mécanisme d'action. Les recherches ont été réalisées sur un modèle de cellules dopaminergiques en culture, les PC12, traitées avec une toxine qui induit un état de stress oxydant. Les effets antioxydants de ce brassinostéroïde ont été étudiés via sa capacité à contrôler la production de radicaux libres et à moduler l'activité d'enzymes antioxydantes tandis que son potentiel anti-apoptotique a été vérifié par l'analyse de la fragmentation de l'ADN, de l'activation de la caspase-3 et de la modulation de l'expression de protéines impliquées dans le processus apoptotique. Les résultats de mon projet de recherche ont permis de montrer que le 24-épibrassinolide renverse certains paramètres de la neurodégénérescence induite par un stress oxydant, notamment par sa capacité à réduire les radicaux libres et à moduler l'activité d'enzymes antioxydantes. Ce brassinostéroïde possède également la capacité de protéger les cellules de la

mort cellulaire induite par le stress oxydant via un processus anti-apoptotique, spécifiquement en diminuant fragmentation de l'ADN et l'activation de la caspase-3 et en modulant l'expression des protéines Bax et la Bcl-2. Ce projet de recherche a donc permis d'approfondir nos connaissances sur les effets des brassinostéroïdes contre le stress oxydant et sur leurs mécanismes d'action. À long terme, cette étude pourrait mener au développement d'un traitement préventif ciblant la prévention de la neurodégénérescence observée dans différentes maladies liées au vieillissement, notamment la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer.

Mots clés : maladie de Parkinson, brassinostéroïde, 24-épibrassinolide, stress oxydant, apoptose, cellules PC12.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	xi
CHAPITRE I INTRODUCTION	1
1.1 LA MALADIE DE PARKINSON (MP).....	1
1.1.1 Historique	1
1.1.2 Épidémiologie.....	2
1.1.3 Neurophysiologie.....	3
1.1.4 Neuropathologie	5
1.1.4.1 Dégénérescence des neurones DAergiques nigrostriés	5
1.1.4.2 Corps de Lewy (CL)	7
1.1.5 Signes cliniques	8
1.1.5.1 Signes neurologiques cardinaux	9
1.1.5.2 Symptômes non moteurs	10
1.2 ÉTOIOLOGIE DE LA MP	11
1.2.1 La MP héréditaire	12
1.2.2 La MP idiopathique.....	12
1.3 LE STRESS OXYDANT.....	13
1.3.1 Les sources de radicaux libres	14
1.3.2 Les radicaux libres : effets bénéfiques ou néfastes ?	17
1.3.3 Les défenses antioxydantes	19
1.3.3.1 Défenses antioxydantes enzymatiques	19
1.3.3.2 Défenses antioxydantes non-enzymatiques.....	22
1.3.4 Le stress oxydant : une rupture d'équilibre.....	23

1.3.5 Les indices de stress oxydant dans la MP.....	23
1.3.5.1 Altération de l'activité du complexe I de la mitochondrie	24
1.3.5.2 L'altération des défenses antioxydantes	25
1.3.6 L'apoptose induite par le stress oxydant	26
1.3.7 Les indices d'apoptose dans la MP	31
1.4 MODÈLES DE RECHERCHE POUR L'ÉTUDE DE LA MP.....	32
1.4.1 Le MPTP et son métabolite actif, le MPP ⁺	32
1.5 TRAITEMENTS DE LA MP	35
1.5.1 Les traitements chirurgicaux et la stimulation cérébrale	36
1.5.2 La dopathérapie	37
1.5.3 Les agonistes DAergiques.....	39
1.5.4 Les nouvelles avenues thérapeutiques	39
1.5.4.1 Vitamine E (α -tocophérol)	40
1.5.4.2 Coenzyme Q ₁₀	41
1.5.4.3 La multithérapie.....	42
1.5.4.4 La gourgane	43
1.6 LES BRASSINOSTÉROÏDES.....	46
1.6.1 Le 24-épibrassinolide (24-épi).....	48
1.7 OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	49
CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES	51
2.1 MATÉRIEL	51
2.2 CULTURE CELLULAIRE	51
2.2.1 Modèle cellulaire	51
2.2.2 Traitement des cellules PC12 différencierées	52
2.3 DÉTECTION DES SUBSTANCES OXYGÉNÉES RÉACTIVES (ROS)	53
2.4 DÉTECTION DES CELLULES APOPTOTIQUES PAR LE MARQUAGE TUNEL ET PAR L'IMMUNOFLUORESCENCE DE LA CASPASE-3 ACTIVÉE	54
2.4.1 Traitement des cellules PC12 différencierées pour la détection de l'apoptose par microscopie à fluorescence.....	56

CHAPITRE III	ARTICLE SCIENTIFIQUE	58
3.1	MA CONTRIBUTION SPÉCIFIQUE AINSI QUE CELLE DES COAUTEURS AU TRAVAIL DE RECHERCHE PRÉSENTÉ DANS L'ARTICLE	58
3.2	RÉSUMÉ DE L'ARTICLE.....	59
3.3	ARTICLE	60
CHAPITRE IV	CONCLUSION	98
BIBLIOGRAPHIE		108

LISTE DES TABLEAUX

1.1	Principaux symptômes non moteurs de la MP	11
1.2	Loci impliqués dans les formes héréditaires de la MP	12
1.3	Comparaison de la durée en heure des périodes “on” et “off” ainsi que la durée du sommeil de patients parkinsoniens consommant leur médication habituelle combinée ou non à la consommation de gourgane	45
1.4	Molécules potentiellement neuroprotectrices visant à orienter les recherches futures sur les composés neuroprotecteurs selon le “Committe to Identify Neuroprotective Agents in Parkinson’s (CINAPS)”	104

LISTE DES FIGURES

1.1	Incidence de la MP selon l'âge et le sexe, 1994-1995	3
1.2	Représentation de la voie nigrostriée	3
1.3	Contrôle de la voie nigrostriée par la substance noire du mésencéphale	4
1.4	Pigmentation de la pcSN. Pigmentation normale en A et perte de cette pigmentation observée dans la MP en B	5
1.5	Distinction entre la mort des neurones DAergiques causée par le vieillissement normal et la dégénérescence de ces neurones observée chez un sujet parkinsonien	7
1.6	A. CL classique dans un neurone DAergique pigmenté de la substance noire B. CL cortical dans le cortex temporal. C et D. Détection immunohistochimique de l'α-syn et de l'ubiquitine des CL dans un neurone de la pcSN	8
1.7	Posture caractéristique d'un patient parkinsonien	10
1.8	Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant	13
1.9	Sites production de ROS dans la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie	15
1.10	Lésions de l'ADN induites par les radicaux libres	18
1.11	Peroxydation lipidique des acides gras	19
1.12	Principaux systèmes enzymatiques antioxydants impliqués dans le contrôle des ROS	21
1.13	Stress oxydant induit par une rupture d'équilibre entre la production et l'élimination de radicaux libres	23
1.14	Effets de la diminution de l'activité du complexe I de la mitochondrie	24
1.15	Voie extrinsèque de l'apoptose	28

1.16	Schéma représentant les principales voies d'activation intrinsèque de l'apoptose	28
1.17	Schéma représentant les principales voies de signalisation impliquées dans l'apoptose	30
1.18	Métabolisme du MPTP	34
1.19	Voies intracellulaires du MPP ⁺	34
1.20	Biodisponibilité de L-dopa pour le cerveau suite à différents traitements à la L-dopa. A. L-dopa seule B. L-dopa/inhibiteur de la DDC C. L-dopa/inhibiteurs de la DDC et de la COM-T	37
1.21	La gourgane	43
1.22	Taux plasmatique de L-dopa après ingestion de 200 g de gourgane et 50 mg de carbidopa (■) ou de 100 mg de lévodopa et 25 mg de carbidopa (▲)	44
1.23	A. Structure du brassinolide B. Structure du 24-épi	47
2.1	Cellules PC12 différencierées (droite) suite à un traitement au NGF pendant 3 jours de cellules PC12 non-différencierées (gauche)	52
2.2	Schéma illustrant la procédure pour les traitements des cellules PC12 neuronales	53
2.3	Oxydation de la DHR 123 en Rhodamine 123 par les ROS	53
2.4	Schéma illustrant la procédure pour les traitements des cellules PC12 neuronales avec un inhibiteur du clivage de la caspase-3 (Z-DEVD-FMK)	57

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

24-épi	24-épibrassinolide
AIF	Facteur inducteur d'apoptose
BHE	Barrière hémato-encéphalique
Brassino	Brassinostéroïde
CAT	Catalase
"CINAPS"	Committe to Identify Neuroprotective Agents in Parkinson's
CL	Corps de Lewy
COM-T	Catéchol-O-méthyl transférase
Cy3	Cyanine 3
Cyt c	Cytochrome c
DA	Dopamine
DAergique	Dopaminergique
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DAT	Transporteur de la dopamine
DD	Domaine de mort cellulaire
DDC	Dopa-décarboxylase
DED	Domaine effecteur de mort cellulaire
DHR	Dihydrorhodamine 123
ER	Récepteur estrogène
FBS	Sérum bovin fœtal
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
IAP	Protéines inhibitrices de l'apoptose
L-dopa	L-3,4-dihydroxyphénylalanine
MAO	Monoamine oxydase
MP	Maladie de Parkinson
MPDP ⁺	1-méthyl-4-phénol-2,3-dihydropyridinium
MPP ⁺	1-méthyl-4-phénylpyridinium

MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,5,6-tétrahydropyridine
NGF	Facteur de croissance neuronale
NM	Neuromélanine
NO [•]	Monoxyde d'azote
NOS	Monoxyde d'azote synthase
O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde
OH [•]	Radical hydroxyle
ONOO ⁻	Peroxynitrite
ONOOH	Nitroperoxyde
pcSN	Pars compacta de la substance noire
RNS	Espèces réactives de l'azote
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SOD	Superoxyde dismutase
SQ [•]	Dopamine-quinone
TH	Tyrosine hydroxylase
VMAT2	Transporteur vésiculaire 2 des monoamines
α-syn	Alpha-synucléine

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 LA MALADIE DE PARKINSON (MP)

1.1.1 Historique

On retrouve des descriptions de tremblements de repos qui étaient probablement d'origine «parkinsonienne» depuis l'an 2500 avant J.-C., mais c'est au médecin généraliste James Parkinson (1755-1824) que revient le mérite d'avoir reconnu des symptômes spécifiques à une maladie, la MP. C'est dans son ouvrage publié en 1817, intitulé "Essay on the Shaking Palsy", qu'il décrit les symptômes caractéristiques qu'il a observés : les tremblements involontaires, l'akinésie et la posture très particulière qui est caractérisée par une propension à pencher le tronc vers l'avant (Petit et al. 1994; Zagnoli and Rouhart 2006). Cette description initiale de la MP demeura inchangée et c'est seulement dans les années 1860 que la description de la maladie se précise. Ainsi, en plus des symptômes de tremblements et d'akinésie décrits par James Parkinson, Jean-Baptiste Charcot, un pionnier de la neurologie, complète l'observation de la maladie en ajoutant la rigidité comme symptôme spécifique à la MP. C'est également ce médecin qui propose en 1880 l'appellation de cette maladie en hommage à l'auteur de la première description, James Parkinson. En 1888, William Gowers précise que la maladie débute habituellement après 40 ans et que le tremblement apparaît initialement unilatéralement, le plus souvent à gauche. Puis, en 1913, Lewy décrit des corps retrouvés dans le cytoplasme des neurones de la substance noire du mésencéphale de patients parkinsoniens et Tretiakoff observe, en 1919, la dépigmentation de cette région du mésencéphale, qu'il attribue à la MP (Petit et al. 1994; Zagnoli and Rouhart 2006). Parallèlement, Guggenheim isole une substance à partir d'haricots, la L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-dopa), le précurseur de la dopamine (DA). C'est seulement lors du début des années 1960 que le rôle de la DA dans la MP

est mis en évidence. C'est également à ce moment que l'on assiste au développement rapide de traitements médicaux, dont la lévodopa qui a été commercialisée en 1970. Depuis, les patients et les médecins ont à leur disposition un grand éventail de moyens thérapeutiques. Malgré toutes ces avancées depuis la découverte de la MP, son étiologie précise demeure à ce jour inconnue (Petit et al. 1994; Zagnoli and Rouhart 2006).

1.1.2 Épidémiologie

La MP est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. On estime que la MP représente environ 2,6 % du total des diagnostics neurologiques. L'incidence annuelle de cette maladie dans les pays industrialisés est d'environ 0,02 % tandis que la prévalence annuelle mondiale s'établit à environ 0,3 %. La prévalence augmente avec l'âge et atteint 1 % chez les gens âgés de plus de 60 ans et 3 % chez ceux âgés de 80 ans et plus (Findley 2007). Au Canada, on estime qu'environ 100 000 Canadiens sont atteints de la MP, dont 25 000 au Québec, et que les taux de prévalence et d'incidence au Canada sont respectivement de 0,1 % et de 0,01 %. De plus, il a été montré que les femmes ont un risque moins élevé d'être atteintes de la MP que les hommes (figure 1.1) (Rubin 2007). En effet, on évalue que le risque de développer la MP pour le groupe d'âge 55 ans à 85 ans est de 8,5 % chez les hommes et 7,7 % chez les femmes (Van Den Eeden et al. 2003). Plusieurs études montrent également que l'alimentation pourrait influencer le risque de développer la MP. Ainsi, une diète caractérisée par une consommation élevée de fruits, de légumes, de grains entiers, de volaille et de poisson est associée avec un risque plus faible d'être atteint de la MP (Gao et al. 2007). L'effet d'une telle alimentation pourrait être dû à la forte concentration d'antioxydants et de folate ainsi qu'à la quantité limitée de gras saturé qui caractérisent ce type de diète. Parmi tous les cas de MP, 85 % des patients ont plus de 65 ans et on prévoit que le nombre de nouveaux cas diagnostiqués va croître de façon

appréciable au cours des 30 prochaines années puisque la population est vieillissante.

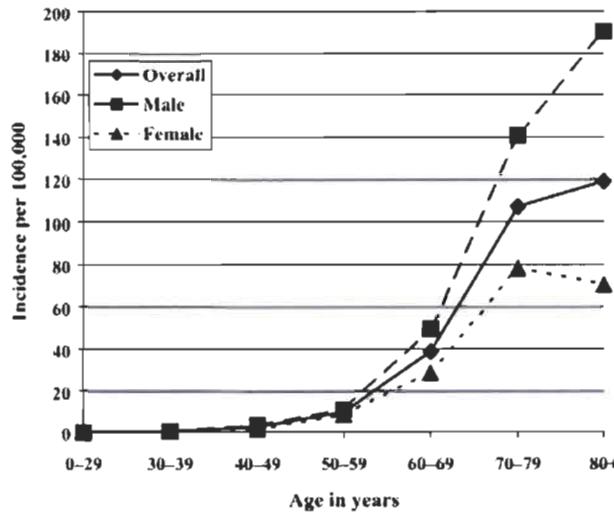


FIGURE 1.1 : Incidence de la MP selon l'âge et le sexe, 1994-1995 (Van Den Eeden et al. 2003).

1.1.3 Neurophysiologie

La MP résulte de la dégénérescence des neurones de la substance noire du mésencéphale (locus niger) qui sécrètent de la DA, un neurotransmetteur qui agit sur le noyau caudé et le putamen, lesquels forment le striatum (figure 1.2).

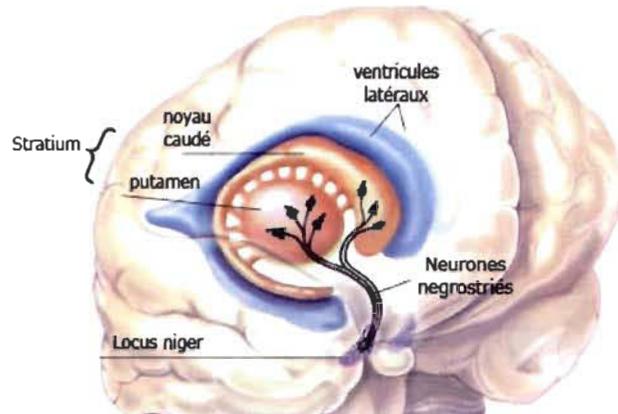


FIGURE 1.2 : Représentation de la voie nigrostriée (Gaëtan Garraux et al. 2008).

Les noyaux de la base du cerveau regroupent deux groupes de noyaux : le striatum et le pallidum. Le noyau caudé, qui est une partie du striatum, reçoit

des projections provenant de différentes régions associatives corticales, soient des régions préfrontale, temporaire, pariétale et cingulaire. L'aire motrice projette plutôt sur le putamen, qui est l'autre partie du striatum. Comme illustré à la figure 1.3, l'activité du striatum est sous le contrôle de la *pars compacta* de la substance noire (pcSN) du mésencéphale. La voie extrapyramidal correspond d'ailleurs au système formé des noyaux de la base et de la substance noire (Vanderheyden and Bouilliez 2004). Dans le cadre de la MP, les lésions dopaminergiques (DAergiques) induisent une baisse de l'inhibition du globus pallidus et donc une augmentation de l'inhibition exercée par le globus pallidus sur le thalamus. Finalement, on observe une diminution de signaux projetés du thalamus vers le cortex moteur. La perturbation de cette voie entraîne le développement de troubles moteurs caractéristiques de la MP (Abdel-Salam 2008; Dauer and Przedborski 2003; Vanderheyden and Bouilliez 2004). Les syndromes parkinsoniens se manifestent lorsque 70 % à 80 % des neurones qui constituent la substance noire du mésencéphale sont détruits (Youdim and Riederer 1997).

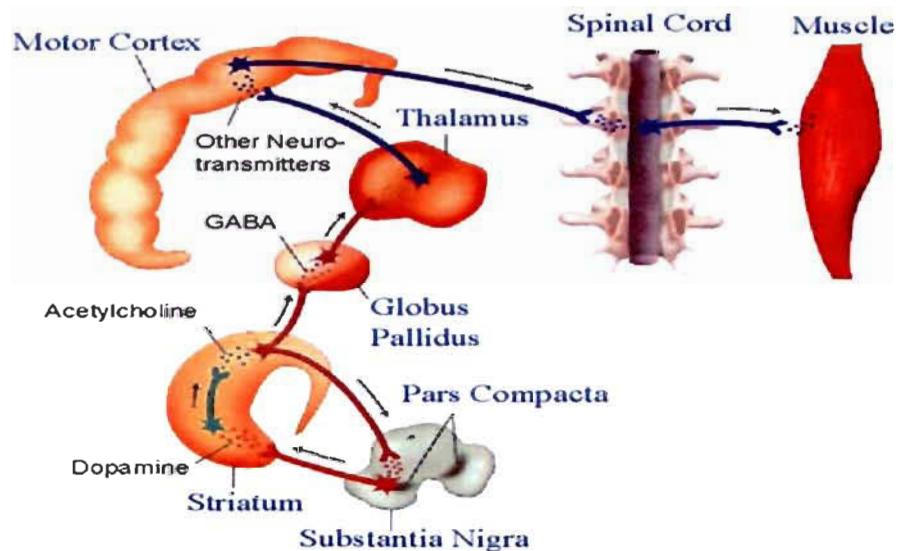


FIGURE 1.3 : Contrôle de la voie nigrostriée par la substance noire du mésencéphale (Youdim and Riederer 1997).

1.1.4 Neuropathologie

La MP est caractérisée par une destruction des neurones DAergiques de la substance noire ainsi que par la présence d'inclusions cytoplasmiques de forme arrondie dans les neurones, les corps de Lewy (CL). Ces signes de dégénérescence ont d'ailleurs été observés et associés à la MP dès le début des années 1910. La description et le rôle des CL sont décrits à la section 1.1.4.2.

1.1.4.1 Dégénérescence des neurones DAergiques nigrostriés

Le corps cellulaire des neurones nigrostriés est situé dans la pcSN du mésencéphale et projettent vers le putamen. La dégénérescence de ces neurones provoque une dépigmentation de la pcSN, caractéristique à la MP (figure 1.4).

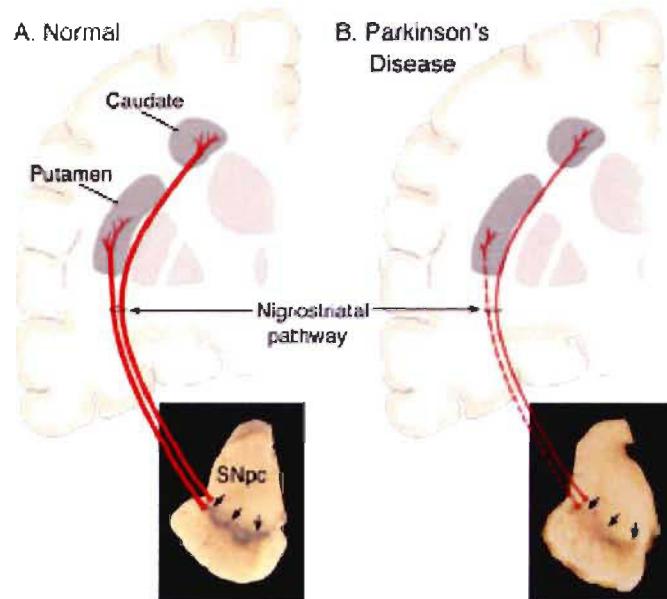


FIGURE 1.4 : Pigmentation de la pcSN. Pigmentation normale en A et perte de cette pigmentation observée dans la MP en B (Dauer and Przedborski 2003).

En effet, les corps de ces neurones contiennent une quantité importante de neuromélanine (NM), un type de mélanine qui a une apparence et une

structure semblables à la mélanine cutanée. La NM est d'ailleurs retrouvée uniquement dans deux types de cellules sécrétrices de catécholamines : les cellules noradrénergiques et DAergiques. Ce pigment est formé de mélanine et de produits de la dégradation par auto-oxydation de la DA (DA-quinone, DA-semiquinone). Ainsi, le fait que la MP est caractérisée par la dégénérescence de cellules contenant ce pigment suggère un rôle de la NM dans la neurodégénérescence. Il a d'ailleurs été suggéré que ce pigment, qui possède une forte affinité pour différents métaux et principalement le fer, contribue au stress oxydant par la formation de radicaux libres via la réaction de Fenton (Fahn and Sulzer 2004; Fedorow et al. 2005). Par contre, certaines recherches ont montré que la NM possèderait un rôle neuroprotecteur par sa capacité à réagir avec des molécules toxiques, telles que les pesticides, et ainsi préviendrait l'accumulation intracellulaire de composés toxiques (D'Amato et al. 1986). Malgré que le rôle de la NM dans la MP n'est pas encore entièrement compris, ce pigment semble contribuer à la progression de la neurodégénérescence caractéristique de cette maladie (Double 2006; Fedorow et al. 2005).

La mort neuronale est un phénomène naturel lié au vieillissement et on estime qu'un sujet sain dans la cinquantaine ne possède plus que 40 % du nombre initial de neurones DAergiques (figure 1.5). Par contre, le vieillissement normal ne mène pas au développement de la MP puisque celle-ci apparaît lorsque la perte neuronale est d'environ 80 % (figure 1.5) (Dauer and Przedborski 2003; Zagnoli and Rouhart 2006).

Il est à noter que la dégénérescence des neurones DAergiques dans la MP est concentrée dans les régions ventrolatérale et caudale de pcSN. Cette perte neuronale est donc spécifique à cette maladie puisque c'est la région dorsomédiale de la pcSN qui est affectée lors du vieillissement normal (Dauer and Przedborski 2003).

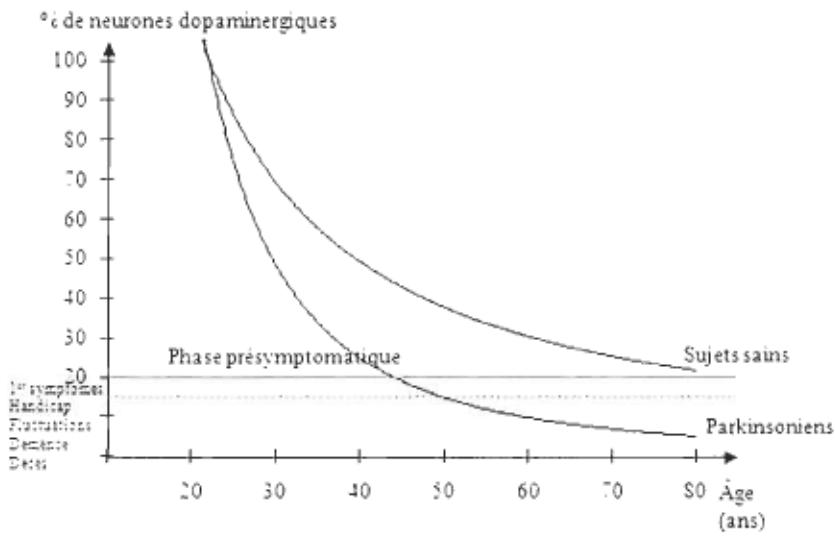


FIGURE 1.5 : Distinction entre la mort des neurones DAergiques causée par le vieillissement normal et la dégénérescence de ces neurones observée chez un sujet parkinsonien (Zagnoli and Rouhart 2006).

1.1.4.2 Corps de Lewy (CL)

La présence de CL est fortement associée à la MP, mais ces inclusions neuronales sont également retrouvées dans d'autres maladies neurodégénératives (Dauer and Przedborski 2003; Lotharius and Brundin 2002). Néanmoins, la détection de CL dans le mésencéphale est un signe très évocateur de la MP (Dauer and Przedborski 2003; Kontakos and Stokes 1999).

Les CL, dont la taille varie entre 5 et 25 µm, sont divisés en deux classes selon leur morphologie. Ainsi, les CL classiques sont des inclusions éosinophiles et de formes arrondies ou allongées avec une zone centrale dense et un halo pâle en périphérie tandis que les CL corticaux sont également éosinophiles mais ont une structure irrégulière (figure 1.6 A et B). Ces deux classes de CL ont une structure filamentuse similaire aux neurofilaments mais d'une densité plus importante. La différence entre la zone centrale et le halo des CL est d'ailleurs provoquée par la différence dans la densité des filaments (Dauer and Przedborski 2003; Wakabayashi et al. 2007).

Les CL sont présents dans différentes régions du système nerveux central, tels que l'hypothalamus, le noyau basal de Meynert et la substance noire. À ce jour, plus de 70 molécules ont été identifiées dans les CL, principalement de l'alpha-synucléine (α -syn), mais également des neurofilaments, des protéines impliquées dans le système ubiquitine-protéasome, des protéines kinases et des protéines du cytosquelette (figure 1.6 C et D) (Wakabayashi et al. 2007). Il est à noter que l'on ne retrouve pas d'ADN, de glucides, de fer, ni de plomb dans les CL. Les CL sont donc des marqueurs de la neurodégénérescence, mais leur rôle dans le développement de la MP n'est pas encore parfaitement compris. Certaines études suggèrent d'ailleurs que ces inclusions neuronales pourraient avoir une fonction neuroprotectrice en séquestrant et en dégradant l'accumulation de protéines toxiques (Olanow et al. 2004).

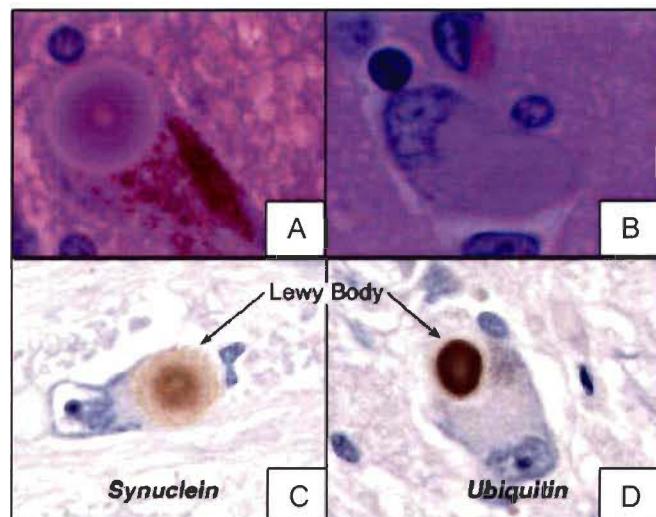


FIGURE 1.6 : A. CL classique dans un neurone DAergique pigmenté de la substance noire B. CL cortical dans le cortex temporal (Wakabayashi et al. 2007). C et D. Détection immunohistochimique de l' α -syn et de l'ubiquitine des CL dans un neurone de la pcSN (Dauer and Przedborski 2003).

1.1.5 Signes cliniques

Malgré que la confirmation formelle de la présence de la MP soit seulement effectuée suite au décès du patient, le diagnostic de cette maladie

repose sur l'évaluation clinique des symptômes ainsi que sur l'examen neurologie effectué par un médecin. La MP est bien connue pour ses troubles moteurs, mais ces symptômes sont souvent accompagnés de problèmes non moteurs. Les symptômes varient tout au long de l'évolution de cette maladie et s'intensifient avec le temps.

1.1.5.1 Signes neurologiques cardinaux

La MP est caractérisée par trois symptômes moteurs et on peut parler de parkinsonisme lorsque deux de ces trois troubles moteurs sont présents : soit le tremblement au repos, l'akinésie et l'hypertonie. Tout d'abord, 50 % à 70 % des MP débutent par des tremblements au repos qui apparaissent souvent au niveau des membres supérieurs et de façon unilatérale (Zagnoli and Rouhart 2006). Ces tremblements sont plutôt lents, asymétriques et disparaissent lors du mouvement volontaire. Dans la MP, on observe également une hypertonie du tonus musculaire qui correspond à un état de contraction des muscles au repos. Comme pour les tremblements au repos, la rigidité est unilatérale au début de la maladie. Cette rigidité musculaire explique en partie les troubles de la marche caractéristiques des patients parkinsoniens, soit une marche à petits pas avec le dos voûté et la tête fléchie vers l'avant (figure 1.7).

De plus, le patient atteint de la MP présente de l'akinésie, qui consiste en une difficulté à initier et à exécuter des mouvements volontaires. Ce symptôme regroupe également la bradykinésie qui correspond à une lenteur d'exécution des mouvements ainsi qu'une réduction de l'amplitude de ceux-ci, soit l'hypokinésie. Ainsi un patient parkinsonien effectue des mouvements lents, incomplets et à retardement (Petit et al. 1994; Vanderheyden and Bouilliez 2004; Weintraub et al. 2008a; Zagnoli and Rouhart 2006).

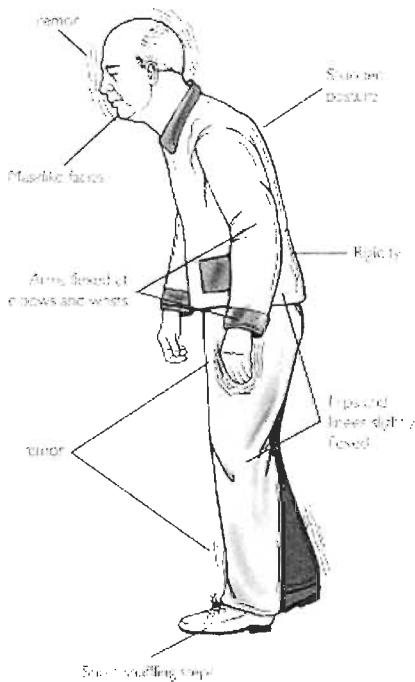


FIGURE 1.7 : Posture caractéristique d'un patient parkinsonien (Lees et al. 2009).

D'autres signes importants permettent de confirmer le diagnostic tels que l'instabilité posturale, la progressivité des symptômes, l'unilatéralité ainsi qu'une bonne réponse à la levodopa. L'instabilité posturale est un trouble de l'équilibre qui peut provoquer des chutes et est un signe tardif de la MP, ce qui explique pourquoi ce symptôme n'est pas utilisé pour le diagnostic. Il constitue par contre un trouble moteur important puisqu'il entraîne un handicap important chez le patient parkinsonien.

1.1.5.2 Symptômes non moteurs

En plus des troubles moteurs caractéristiques de la MP, de nombreux autres signes sont observés au cours de cette maladie. Ces divers symptômes, qui sont d'ailleurs décrits dans l'article de Daniel Weintraub (Weintraub et al. 2008a) et dans le livre intitulé «La Maladie de Parkinson; clinique et thérapeutique» des éditions Masson (Petit et al. 1994), ont des répercussions importantes sur la qualité de vie des patients parkinsoniens. Par exemple, on dénote des modifications de l'état mental, particulièrement des troubles

dépressifs et intellectuels, des troubles urinaires et des troubles du sommeil (tableau 1.1).

TABLEAU 1.1
Principaux symptômes non moteurs de la MP
(Petit et al. 1994; Weintraub et al. 2008a)

1. Signes psychologiques et psychiatriques	2. Signes sensoriels	3. Signes autonomes
<ul style="list-style-type: none"> - dépression, - anxiété, - démence, - hallucination, - sommeil fragmenté, - cauchemars. 	<ul style="list-style-type: none"> - douleurs, - crampes, - paresthésies - déficit olfactif - déficit de la perception de contrastes visuels. 	<ul style="list-style-type: none"> - anomalies cardio-vasculaires, - troubles gastro-intestinaux : <ul style="list-style-type: none"> • perte de poids • hypersialorrhée • troubles de la déglutition • constipation - trouble vésical, - trouble de thermorégulation, - troubles sexuels.

1.2 ÉTIOLOGIE DE LA MP

Depuis les premières descriptions de la MP, d'immenses progrès ont été accomplis dans le but de mieux comprendre la progression et les divers aspects de cette maladie neurodégénérative. Néanmoins, l'étiologie de la MP n'est toujours pas complètement élucidée. Plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'expliquer la dégénérescence des neurones DAergiques caractéristique de cette maladie. Par exemple, dans les années 1920, l'hypothèse de l'origine infectieuse de la MP a été évoquée suite à une épidémie d'encéphalite léthargique (Zagnoli and Rouhart 2006). Toutefois, aucune recherche n'a réussi à mettre en évidence un lien entre la MP et ce virus (Kontakos and Stokes 1999; Zagnoli and Rouhart 2006). D'autres hypothèses ont également été suggérées, telles que le vieillissement accéléré et les traumatismes. À ce jour, les mécanismes toxiques et génétiques sont des facteurs fréquemment évoqués dans l'étiologie de la MP. Malgré que les mécanismes à l'origine de la destruction massive des neurones DAergiques de la pcSN commencent à être expliqués, les causes précises demeurent hypothétiques.

1.2.1 La MP héréditaire

Pendant de nombreuses années, les chercheurs se sont principalement intéressés aux facteurs de risques environnementaux. Toutefois, la découverte de l'importance des antécédents familiaux comme facteur de risque de la MP a provoqué un regain d'intérêt pour les facteurs génétiques. En effet, dans environ 5 % des cas, l'étiologie de la MP est associée à des facteurs génétiques. À ce jour, 13 loci ont été identifiés et reliés à des formes héréditaires de la MP (tableau 1.2). Les formes héréditaires et sporadiques de la MP sont très similaires, mais les formes héréditaires se manifestent généralement plus tôt que l'âge moyen d'apparition et sont associées au développement de symptômes atypiques (Vila and Przedborski 2004).

TABLEAU 1.2
Loci impliqués dans les formes héréditaires de la MP
(AD, autosomal dominant; AR, autosomal récessif;
LB, corps de Lewy; SP, sporadique)
(Mizuno et al. 2008)

type	loci	genes	Inh	LB
PARK1	4q21-23	α -synuclein (SNCA)	AD	+
PARK2	6q25.20-27	parkin (PRKN)	AR	±
PARK3	2p13	unknown	AD	+
PARK4	4q21-23	α -synuclein (SNCA)	AD	+
PARK5	4p14	UCH-L1	AD	
PARK6	1p35-36	PINK1	AR	+
PARK7	1p36	DJ-1	AR	
PARK8	12p11.2-q13.1	LRRK2	AD	±
PARK9	1p36	ATP13A2	AR	
PARK10	1p32	unknown	SP	
PARK11	2q36-37	unknown	AD	
PARK12	Xq21-25	unknown	SP	
PARK13	2p13	Omi/HtrA2	AD?	

1.2.2 La MP idiopathique

Dans 95 % des cas de MP, on ignore la cause de la destruction des neurones de la pcSN qui conduit au déficit en DA (Dauer and Przedborski 2003). De nombreuses hypothèses ont été avancées afin d'expliquer l'apparition de cette maladie, mais aucune ne fait entièrement l'unanimité. Parmi ces

hypothèses, le stress oxydant est un facteur fréquemment évoqué comme étant impliqué dans le développement de la MP.

1.3 LE STRESS OXYDANT

Le stress oxydant semble être impliqué dans de multiples maladies liées au vieillissement, telles que la maladie d'Alzheimer, l'artériosclérose et la cataracte (Favier 2006; Mates and Sanchez-Jimenez 1999). L'hypothèse d'une corrélation entre le vieillissement et le stress oxydant a été proposée pour la première fois par le Dr Denham Harman en 1956 (Harman 1956). Ainsi, il suggérait que les radicaux libres endogènes seraient responsables du processus du vieillissement.

Un radical libre est une espèce chimique qui possède un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe (figure 1.8). La présence d'un électron non apparié confère à ces molécules une grande instabilité, c'est-à-dire qu'elles sont extrêmement réactives et que leur durée de vie est courte.

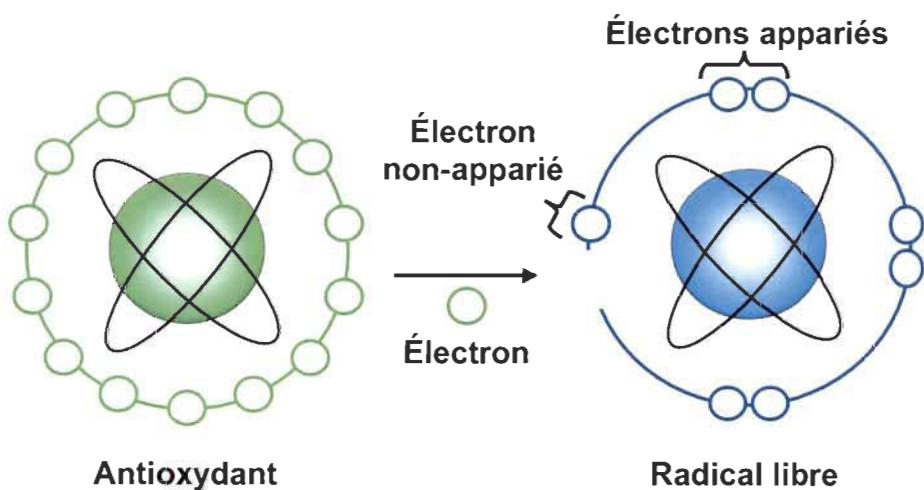


FIGURE 1.8 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant.

Les radicaux libres agissent comme des accepteurs d'électrons et arrachent donc des électrons à d'autres molécules. Cette perte caractéristique

d'un électron correspond au phénomène d'oxydation et les radicaux libres sont donc considérés comme des agents oxydants puisqu'ils incitent les molécules à donner des électrons (Gilgun-Sherki et al. 2001).

Parmi les différentes classes de radicaux libres, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont les radicaux les plus abondants. Cette classe de radicaux libres regroupe des radicaux qui dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron, comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), le radical peroxyl (RO_2^{\cdot}), le radical alkoxyle (RO^{\cdot}) et le radical perhydroxyle (HO_2^{\cdot}). Le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) et le dioxyde d'azote (NO_2^{\cdot}) appartiennent à une autre classe de radicaux libres, les espèces réactives de l'azote (RNS). Les ROS et RNS peuvent être converties en espèces réactives qui ne sont pas des radicaux libres telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypobromeux ($HOBr$) et le nitroperoxyde ($ONOOH$). Il est à noter que ces molécules sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres dérivés de l'oxygène et leurs précurseurs sont appelés ROS. Parmi ces ROS, les radicaux $O_2^{\cdot-}$ et OH^{\cdot} sont considérés les plus réactifs. (Fang et al. 2002; Favier 2006).

1.3.1 Les sources de radicaux libres

Les êtres humains sont constamment exposés aux radicaux libres. En effet, les sources de radicaux libres sont variées : la pollution atmosphérique, la cigarette, le rayonnement UV, les radiations ionisantes, les radiations cosmiques, le métabolisme cellulaire (activité mitochondriale, réactions enzymatiques), l'inflammation et les métaux toxiques (chrome, cuivre) (Favier 2006; Uttara et al. 2009). Le métabolisme cellulaire et l'inflammation sont considérés comme les principales sources endogènes de radicaux libres.

De nombreuses études suggèrent que la mitochondrie est la source principale de ROS endogènes (Kannan and Jain 2000; Sherer et al. 2002). En

effet, environ 80 % de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente, soit l'ajout de 4 électrons qui conduit à la production d'eau (équation [1.1]) (Halliwell 2006).



Cette réaction se produit dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons dans la membrane interne de la mitochondrie. Par contre, une faible quantité d'électrons peut s'échapper de la chaîne de transport des électrons et ainsi réduire en partie l'oxygène. On estime qu'environ 2 % de l'oxygène utilisé par la respiration subit une réduction monoélectronique, soit l'ajout d'un électron à une molécule d'oxygène qui conduit à la formation d'un radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ au niveau de l'ubiquinone (ou coenzyme Q₁₀) (équation [1.2]) (Halliwell 2006).



La production de $\text{O}_2^{\cdot-}$ se produit au niveau de deux sites précis de la chaîne de transport des électrons, soit au niveau du complexe I et III, soit respectivement la NADH-coenzyme Q oxydoréductase et la coenzyme Q-cytochrome C oxydoréductase (figure 1.9) (Balaban et al. 2005).

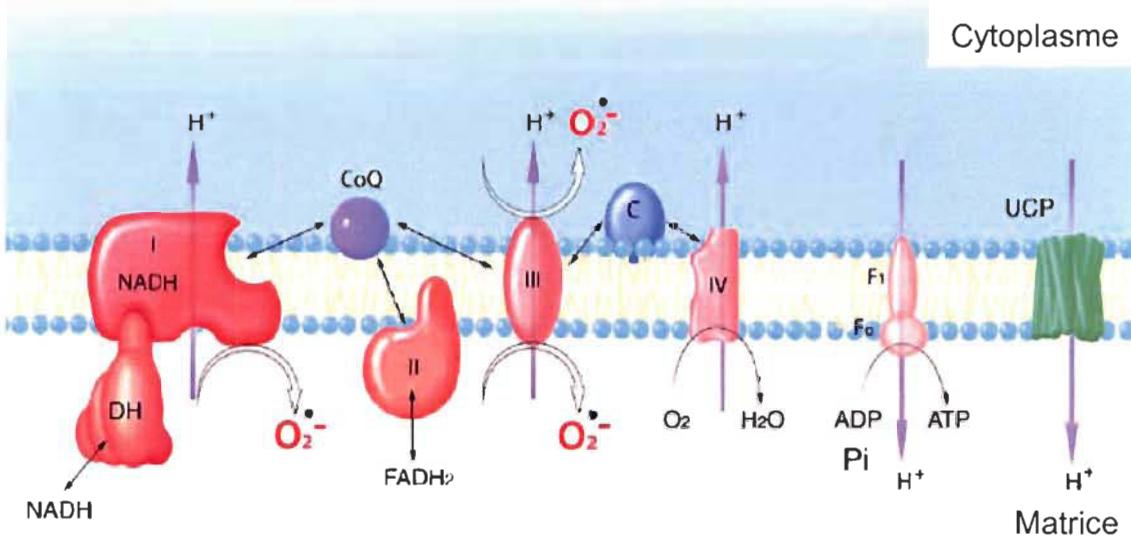
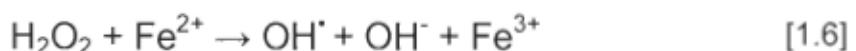
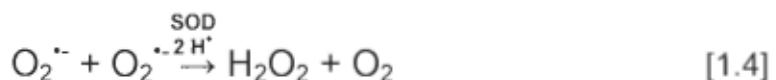


FIGURE 1.9 : Sites production de ROS dans la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie (Balaban et al. 2005).

L'oxydation par l'oxygène de différents composés peut également induire la production de $O_2^{\cdot\cdot}$. Cette réaction d'auto-oxydation se produit fréquemment chez les monoamines, des molécules caractérisées par un groupe azoté lié à un groupe aminé. Par exemple, cette classe de molécules regroupe la sérotonine et les catécholamines (DA,adrénaline,noradrénaline). Dans le cadre de la MP, il a été montré que les neurones DAergiques étaient particulièrement exposés à une grande quantité de ROS induite par le métabolisme de la DA. En effet, la DA peut s'auto-oxyder à un pH normal et ainsi former du H_2O_2 , des $O_2^{\cdot\cdot}$ et des dopamine-quinones (SQ $^{\cdot}$) (équation [1.3]) (Graham 1978).



Le radical $O_2^{\cdot\cdot}$ n'est pas une molécule extrêmement réactive, mais elle peut être convertie en H_2O_2 par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) (équation [1.4]) ou en peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$) en présence de NO^{\cdot} (équation [1.5]) (Lotharius and Brundin 2002). À un pH physiologique, le $ONOO^{\cdot}$ se transforme rapidement en $ONOOH$, une molécule très réactive. Le H_2O_2 est une molécule relativement toxique et la majeure partie de sa toxicité provient de sa capacité à produire le radical OH^{\cdot} en présence de cations métalliques tels que le Fe^{2+} et le Cu^+ . La réaction du H_2O_2 avec le Fe^{2+} correspond à la réaction de Fenton (équation [1.6]). Il est à noter que le radical OH^{\cdot} et l'anion basique OH^- formés au cours de cette réaction sont deux espèces chimiques différentes. En effet, ces molécules possèdent une différence de réactivité causée par la présence d'électrons non appariés (OH^{\cdot}) ou non (OH^-) (Favier 2006; Halliwell 2006; Lotharius and Brundin 2002).



L'inflammation est également considérée comme une source importante de ROS. Il a été montré qu'une grande quantité de ROS est produit par les cellules immunitaires, plus particulièrement les cellules phagocytaires. Ces cellules produisent des $O_2^{\cdot-}$, des OH^{\cdot} et du H_2O_2 pour éliminer les microorganismes pathogènes et les cellules cancéreuses. En effet, afin d'assurer la défense de l'organisme, les phagocytes utilisent le phénomène d'explosion oxydative, qui consiste à l'activation du complexe NADPH oxydase. Cette enzyme utilise l'oxygène pour produire des $O_2^{\cdot-}$ en grande quantité au niveau de la membrane cytoplasmique et ceux-ci sont libérés à la face externe de cette membrane. Il est à noter que le complexe est actif que lorsque la cellule phagocytaire est activée. Il y a également une autre voie métabolique dépendante de l'oxygène qui contribue à l'élimination des microorganismes pathogènes, soit l'induction d'une enzyme NO-synthase (NOS). En effet, certaines cellules phagocytaires sont capables, après activation de la NOS inducible, de produire des dérivés nitrés, tels que le NO^{\cdot} . Ainsi, la production simultanée de NO^{\cdot} et de $O_2^{\cdot-}$ dans le milieu s'avère très nocive puisqu'il y a formation de $ONOO^{\cdot}$, un produit très réactif et qui est responsable de la majorité des effets dommageables attribués au NO^{\cdot} (Favier 2006; Salganik 2001).

1.3.2 Les radicaux libres : effets bénéfiques ou néfastes ?

Le paradoxe des radicaux libres réside dans le fait que ce sont des molécules très réactives et dommageables tout en étant indispensables pour différents mécanismes cellulaires. En effet, en réponse à divers stimuli, les organismes aérobiques produisent constamment une petite quantité de radicaux libres et ce faible niveau intervient dans différentes fonctions essentielles. Par exemple, les ROS participent à la transduction de signaux cellulaires, au fonctionnement de certaines enzymes, à la défense immunitaire, à la destruction par apoptose de cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la vasodilatation des vaisseaux et à la différenciation cellulaire (Favier 2006; Mates and Sanchez-Jimenez 1999; Salganik 2001).

Par contre, la production excessive de radicaux libres induit des dommages directs aux différentes molécules biologiques, soient à l'ADN, aux protéines et aux lipides. L'ADN est très vulnérable à l'attaque par les radicaux libres et subit donc différents dommages oxydatifs. Tout d'abord, les bases qui composent l'ADN sont sensibles au phénomène d'oxydation qui induit la modification de celles-ci (figure 1.10). Les radicaux libres peuvent également altérer la liaison entre la base et le désoxyribose, ce qui provoque la création d'un site abasique, ou attaquer directement le sucre créant ainsi une coupure de la chaîne simple brin (figure 1.10) (Favier 2006; Mates and Sanchez-Jimenez 1999).

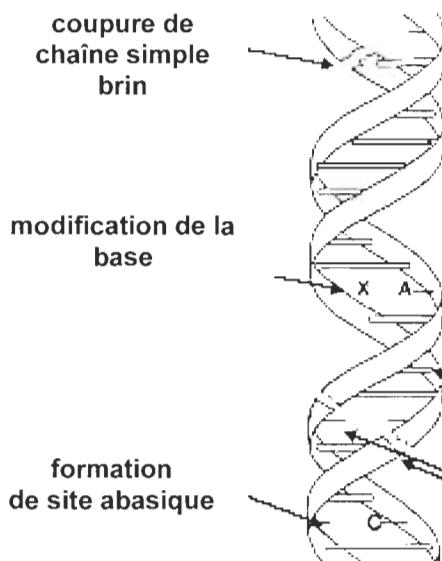


FIGURE 1.10 : Lésions de l'ADN induites par les radicaux libres (Favier 2006).

Les acides gras polyinsaturés des membranes constituent une cible privilégiée par le OH[·] qui arrache un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, une réaction est appelée peroxydation lipidique. Ce mécanisme de dégradation des acides gras membranaires provoque la formation d'hydroperoxydes instables qui induisent une diminution de la fluidité membranaire et donc une modification de différents récepteurs et de la transduction de signaux (figure 1.11) (Favier 2006; Mates and Sanchez-Jimenez 1999).

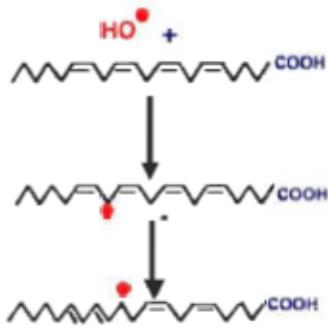


FIGURE 1.11 : Peroxydation lipidique des acides gras (Favier 2006).

Les protéines sont également sensibles aux attaques des radicaux libres, principalement celles dont la structure comporte un groupement sulfhydryle (SH). Ce groupement composé d'un atome de soufre et d'un atome d'hydrogène reliés au moyen d'une liaison simple est retrouvé chez de nombreuses enzymes et des protéines de transport. Les protéines modifiées par oxydation sont inactivées et perdent donc leurs propriétés biologiques (Favier 2006; Mates and Sanchez-Jimenez 1999).

1.3.3 Les défenses antioxydantes

Dans des circonstances normales, les radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité et cette production est d'ailleurs contrôlée par des systèmes de défense qui s'adaptent face à la présence de radicaux libres. Les cellules possèdent donc différentes stratégies antioxydantes afin de contrôler la quantité de radicaux libres. Une stratégie fréquemment retrouvée repose sur la présence de composés antioxydants synthétisés par la cellule contrairement à d'autres apportés par l'alimentation.

1.3.3.1 Défenses antioxydantes enzymatiques

Tout d'abord, il y a les SOD (EC 1.15.11), dont le rôle est d'éliminer les O_2^\bullet par une réaction de dismutation qui produit une molécule d'oxygène et une molécule de H_2O_2 à partir de deux O_2^\bullet (équation [1.4]). Il existe trois isoformes

chez les humains qui sont caractérisés par une structure d'ensemble bien conservée, soit un puit hydrophobe au centre de la protéine dans lequel est piégé le radical O_2^- . La réaction de dismutation est catalysée par la présence au cœur de l'enzyme d'un métal qui est l'élément caractéristique des différents isoformes. Il est à noter que la SOD est caractérisée par une vitesse de réaction remarquablement élevée. Les différents isoformes se distinguent également par leur localisation cellulaire : les SOD à manganèse situées dans la mitochondrie, (Mn-SOD), les SOD à cuivre-zinc (Cu,Zn-SOD) retrouvées dans le cytoplasme et les SOD extracellulaires (EC-SOD) localisées dans les fluides extracellulaires. Il a été suggéré que la Cu,Zn-SOD joue un rôle majeur dans la première ligne de défense antioxydante contre les O_2^- et c'est également l'isoforme le plus abondant chez l'humain (Favier 2006; Johnson and Giulivi 2005; Mates and Sanchez-Jimenez 1999).

La dismutation du radical O_2^- par les SOD induit la production de H_2O_2 . La concentration intracellulaire de ce ROS est contrôlée principalement par deux enzymes, la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). La catalase (EC 1.11.1.6) est une enzyme tétramérique formée de quatre sous-unités identiques comportant chacun un groupe hème. Cette enzyme catalyse la transformation du H_2O_2 en oxygène et en eau (équation [1.7]). La catalase est considérée comme une des enzymes dotée d'une remarquable efficacité, à un tel point qu'elle est insatifiable. Il a également été montré qu'elle possède un rôle important dans le développement d'une réponse adaptative face au stress oxydant (Esposito et al. 2002; Favier 2006; Mates and Sanchez-Jimenez 1999).



La GPx (EC 1.11.1.9) est également une enzyme impliquée dans la détoxicification du H_2O_2 . C'est une enzyme formée de quatre sous-unités identiques comportant chacune un atome de sélénium, ce dernier étant essentiel pour l'activité de cette enzyme. La GPx existe sous au moins cinq

isoformes chez les mammifères. Malgré que l'expression de ces isoformes soit ubiquitaire, leur quantité dépend de leur localisation. Ainsi, on retrouve la GPx-1 et la GPx-4 dans la majorité des tissus au niveau du cytosol ou de la membrane, la GPx-2 dans le tractus gastro-intestinal, la GPx-3 dans le rein et la GPx-5 dans le sperme. Ces enzymes catalysent la réduction de différents hydroperoxydes organiques (ROOH et H₂O₂) en utilisant le glutathion (GSH) comme donneur d'électrons (équation [1.8]) (Arthur 2000; Favier 2006; Mates and Sanchez-Jimenez 1999).



Malgré que la CAT et la GPx partagent le même substrat, il a été suggéré que la GPx serait une source importante de protection contre les faibles niveaux de stress oxydant tandis que la CAT aurait un rôle plus important dans la protection contre les hauts niveaux de stress oxydant (Halliwell 2006; Mates and Sanchez-Jimenez 1999). Finalement, au niveau cellulaire, l'activité des enzymes antioxydantes SOD, CAT et GPx doit être complémentaire car une protection efficace contre les ROS ne peut être obtenue seulement par l'activité des SOD (figure 1.12).

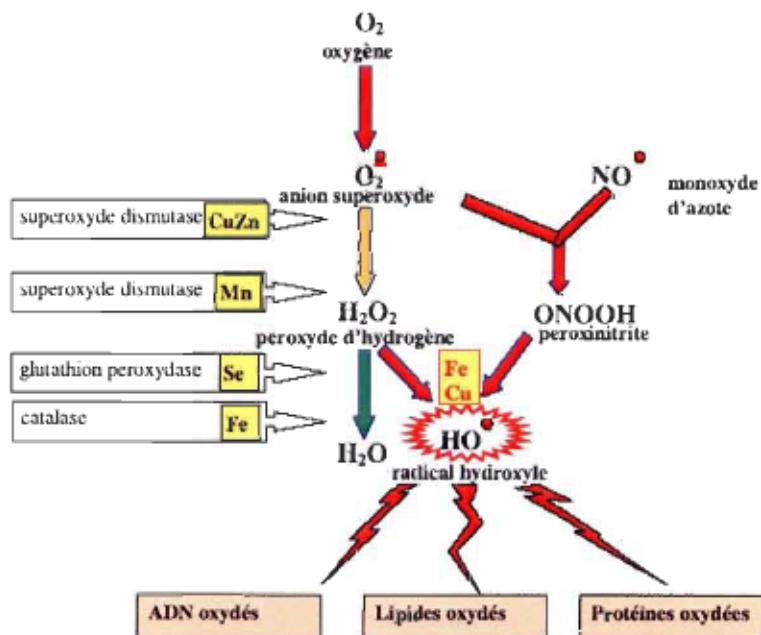


FIGURE 1.12 : Principaux systèmes enzymatiques antioxydants impliqués dans le contrôle des ROS (Favier 2006).

Il existe de nombreuses autres enzymes qui possèdent une activité enzymatique, mais les SOD, CAT et GPx constituent les principales enzymes impliquées dans la stratégie de défense antioxydante enzymatique.

1.3.3.2 Défenses antioxydantes non-enzymatiques

Différents composés antioxydants non-enzymatiques sont apportés via l'alimentation, tels que les vitamines E (tocophérol) et C (acide L-ascorbique), les caroténoïdes, les flavonoïdes et les polyphénols. La vitamine C est reconnue pour sa capacité à neutraliser les radicaux $O_2^{.-}$ et OH^{\cdot} ainsi que les hydroperoxydes produits par la peroxydation lipidique. La vitamine E existe sous huit formes, dont la plus active, l'alpha-tocophérol (α -tocophérol), inhibe la peroxydation lipidique. Les caroténoïdes ont la capacité de neutraliser différents ROS. Ces composés antioxydants non-enzymatiques ont la capacité de capter et de stabiliser l'électron non apparié des radicaux libres et ainsi les transformer en ions stables (figure 1.8). Comme produit de cette réaction, les vitamines se retrouvent elles-mêmes avec un électron non-apparié et elles vont être régénérées sous leur forme stable par un autre système enzymatique. Par exemple, l' α -tocophérol est régénérée par la vitamine C. Plusieurs études suggèrent également que les vitamines exercent un effet sur les enzymes antioxydantes en augmentant leur activité (Esposito et al. 2002; Fang et al. 2002; Favier 2006).

Les polyphénols regroupent des molécules naturelles possédant des structures phénoliques variables notamment retrouvées dans les fruits, les légumes, les céréales, les fleurs, le thé et le vin. Ces molécules peuvent être divisées en différents groupes selon leur structure moléculaire. Parmi ces groupes de polyphénols, on distingue les flavonoïdes qui regroupent plus de 4 000 composés (D'Archivio et al. 2007). La quercétine et le curcumin sont des exemples de flavonoïdes très connus. Les polyphénols sont des molécules très intéressantes puisqu'elles ont la capacité de prévenir les dommages induits par

les ROS (Esposito et al. 2002; Stevenson and Hurst 2007; Virgili and Marino 2008). En effet, en plus de neutraliser les radicaux libres en captant leur électron non apparié, ces molécules pourraient augmenter l'activité d'enzymes antioxydantes.

1.3.4 Le stress oxydant : une rupture d'équilibre

Dans des conditions physiologiques normales, il y a un équilibre entre les radicaux libres et les défenses antioxydantes. Lorsque la cellule ne contrôle plus la quantité de radicaux libres, dû à un déficit en antioxydants ou une surproduction de radicaux libres, on observe un excès de ces molécules instables, appelé stress oxydant. Cette rupture d'équilibre peut causer des dommages cellulaires importants pouvant aller jusqu'à provoquer la mort cellulaire par apoptose ou nécrose (figure 1.13) (Esposito et al. 2002; Favier 2006; Lotharius and Brundin 2002).

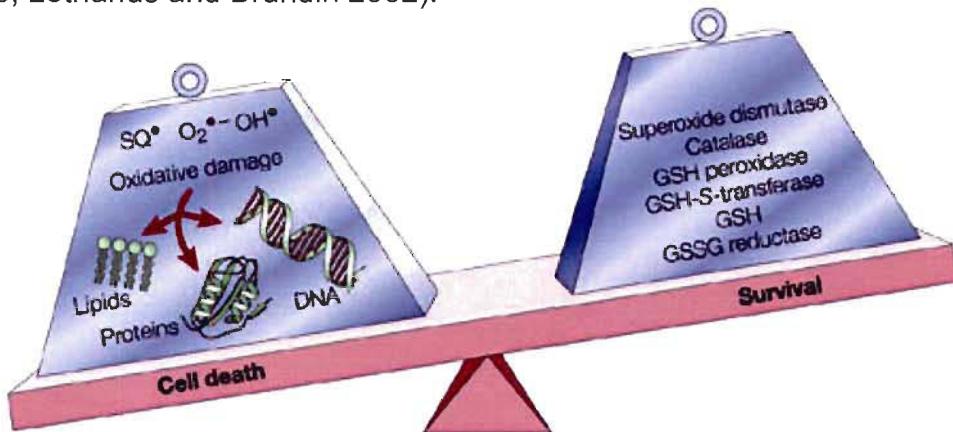


FIGURE 1.13 : Stress oxydant induit par une rupture d'équilibre entre la production et l'élimination de radicaux libres (Lotharius and Brundin 2002).

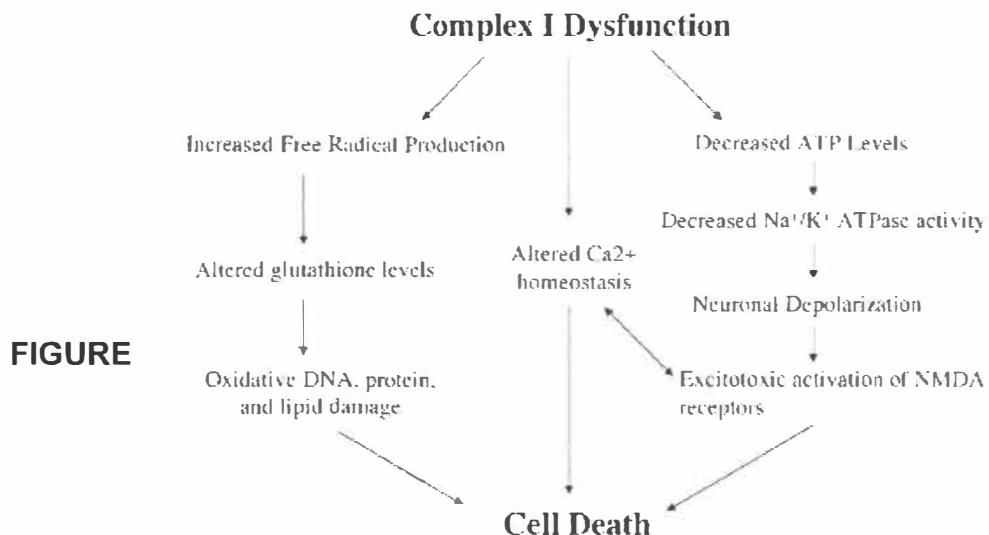
1.3.5 Les indices de stress oxydant dans la MP

Plusieurs études suggèrent l'implication du stress oxydant dans la dégénérescence neuronale caractéristique de la MP (Dauer and Przedborski 2003; Esposito et al. 2002; Sherer et al. 2002). En effet, des recherches ont

montré des altérations de l'activité du complexe I de la mitochondrie et de l'activité d'enzymes antioxydantes dans les neurones DAergiques de la pcSN de patients atteints de la MP, favorisant ainsi un état de stress oxydant (Dauer and Przedborski 2003; Esposito et al. 2002; Sherer et al. 2002).

1.3.5.1 Altération de l'activité du complexe I de la mitochondrie

Une altération de l'activité du complexe I de la mitochondrie dans les neurones DAergiques a été détectée pour la première fois en 1989 (Schapira et al. 1989). Cette anomalie se situe seulement au niveau du complexe I et n'est pas seulement retrouvée dans les cellules neuronales. Par exemple, cette altération de l'activité du complexe I est également retrouvée au niveau des thrombocytes (Parker, Jr. et al. 1989). Ainsi, plusieurs études ont montré que la réduction de l'activité du complexe I de la mitochondrie observée dans la MP entraîne le blocage de la chaîne de transport des électrons et provoque donc la mort cellulaire, notamment via l'augmentation de la production de ROS, l'altération de l'homéostasie du calcium ou l'hyperactivation des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (figure 1.14) (Cassarino et al. 1999; Dauer and Przedborski 2003; Esposito et al. 2002; Sherer et al. 2002).



FIGURE

1.14 : Effets de la diminution de l'activité du complexe I de la mitochondrie (Sherer et al. 2002).

Il a été montré que le blocage de la chaîne de transport des électrons provoque une augmentation de la production de ROS. Le potentiel antioxydant de la cellule est alors insuffisant et l'équilibre est renversé. Ces différentes molécules instables peuvent alors provoquer des dommages cellulaires en réagissant avec les lipides, les protéines et les acides nucléiques. Beaucoup d'études montrent d'ailleurs la présence de différents indices de dommages reliés au stress oxydant chez les patients atteints de la MP. On retrouve notamment la peroxydation lipidique et des modifications au niveau des protéines et de l'ADN (Andersen 2004; Dauer and Przedborski 2003; Fiskum et al. 2003; Sofic et al. 2006; Zhou et al. 2008).

L'inhibition du complexe I de la mitochondrie affecte également le niveau d'ATP de la cellule ainsi que l'homéostasie du calcium (figure 1.14). L'ATP possède un rôle important dans la régulation de l'homéostasie des cellules et sa production dans les neurones dépend essentiellement de l'activité mitochondriale. Une diminution du niveau d'ATP induit une dépolarisation neuronale, ce qui provoque une activation excessive des récepteurs NMDA. Il y a alors une importante accumulation intracellulaire de calcium et les neurones deviennent très vulnérables. L'altération du niveau d'ATP affecte également le stockage de la DA dans les vésicules présynaptiques. En effet, il y a diminution de l'activité du transporteur vésiculaire 2 des monoamines (VMAT2) responsable du stockage de la DA. La concentration de DA libre dans le cytosol augmente et la DA est alors plus susceptible de produire des réactions dommageables pour la cellule, notamment via l'auto-oxydation de la DA (équation [1.3]) (Andersen 2004; Fiskum et al. 2003; Sherer et al. 2002).

1.3.5.2 L'altération des défenses antioxydantes

En plus d'une surproduction de ROS, un état de stress oxydant peut également être initié par une insuffisance du système de défenses antioxydantes. Différentes études ont d'ailleurs montré une diminution de la

concentration en GSH chez les parkinsoniens, une molécule essentielle à l'activité de l'enzyme antioxydante GPx (équation [1.8]) (Pearce et al. 1997; Riederer et al. 1989). Une réduction de l'activité des enzymes CAT et GPx a également été détectée dans des échantillons de pcSN de patients atteints de la MP (Ambani et al. 1975; Dringen and Hirrlinger 2003; Sofic et al. 1992). Toutefois, plusieurs études suggèrent que l'augmentation de l'activité des défenses antioxydantes serait une réponse compensatoire de la cellule face au stress oxydant, mais cette augmentation serait insuffisante pour contrôler la surproduction de ROS (Gilgun-Sherki et al. 2001; Johnson and Giulivi 2005; Saggu et al. 1989). Ainsi, une augmentation de l'activité de la SOD a été détectée dans la pcSN de patients atteints de la MP (Kunikowska and Jenner 2003; Marttila et al. 1988; Saggu et al. 1989). Néanmoins, cette augmentation de la production de H₂O₂ par la SOD n'est pas contrebalancée par une hausse de l'activité des enzymes qui catalysent sa détoxicification, puisqu'on observe une diminution de l'activité de la CAT et de la GPx. Ce déséquilibre favoriserait donc un état de stress oxydant. Malgré que toutes ces études montrent une déficience dans le système de défenses antioxydantes (Ambani et al. 1975; Dringen and Hirrlinger 2003; Esposito et al. 2002; Pearce et al. 1997; Riederer et al. 1989; Sofic et al. 1992), les altérations de l'activité des enzymes antioxydantes restent un sujet qui encore débattu débats (Jenner 2003). Plusieurs indices retrouvés dans des échantillons de la pcSN de patients parkinsoniens supportent pourtant un état de stress oxydant qui contribuerait à la dégénérescence neuronale (Fahn and Cohen 1992).

1.3.6 L'apoptose induite par le stress oxydant

Différentes études ont montré que le stress oxydant possède un rôle déterminant dans le déclenchement du processus apoptotique. Plus particulièrement, il a été suggéré que l'altération de l'activité mitochondriale était un des plus importants facteurs pivots provoquant l'apoptose (Kannan and Jain 2000; Kroemer et al. 1997; Zamzami et al. 1995).

L'apoptose est une mort cellulaire programmée déclenchée en réponse à différents signaux provenant de la membrane cellulaire, du cytoplasme, du cytosquelette, de la mitochondrie ou du noyau. Suite à un signal apoptotique, la cellule rétrécit, se déforme et perd contact avec les cellules environnantes. Les cellules en processus apoptotique subissent des changements morphologiques caractéristiques : condensation de la chromatine, convolution des membranes cytoplasmique et nucléaire, condensation du cytoplasme et formation de corps apoptotiques. La conservation de l'intégrité des membranes permettent d'ailleurs d'éviter toute réaction inflammatoire, caractéristique de la mort cellulaire par nécrose. Finalement, les corps apoptotiques, qui contiennent le cytoplasme, la chromatine condensée et les différents organites, sont rapidement phagocytés par les macrophages, évitant à nouveau toute réaction inflammatoire (Zhang et al. 2004).

L'apoptose peut être activée via deux voies principales d'activation, soient une voie extrinsèque et une voie intrinsèque. La voie extrinsèque implique l'activation de récepteurs de mort cellulaire, notamment les récepteurs Fas et le facteur de nécrose tumorale (TNF). Les récepteurs de mort cellulaire possèdent dans leur partie intracellulaire un domaine de mort cellulaire (DD) (figure 1.15). Suite à la liaison d'un ligand, le récepteur de mort cellulaire se trimérisé et recrute des protéines adaptatrices via leur DD, qui sont formées d'un domaine effecteur de mort cellulaire (DED). Les DED permettent de recruter la procaspase-8 et ce complexe se nomme DISC ("death-inducing signaling complex"). Ce complexe initie le déclenchement de la cascade apoptotique par activation de la procaspase-8 (figures 1.15, 1.16 et 1.17).

Parfois, l'activation du récepteur de mort cellulaire n'est pas suffisante pour activer la cascade des caspases. Le signal d'apoptose doit donc être amplifié via la voie intrinsèque de l'apoptose. Pour ce faire, la caspase-8 clive la protéine Bid et c'est sous sa forme clivée (t-Bid) qu'elle se dirige vers la mitochondrie et

favorise sa perméabilisation (figure 1.16) (Andreas Gewies 2003; Schultz and Harrington, Jr. 2003; Zhang et al. 2004).

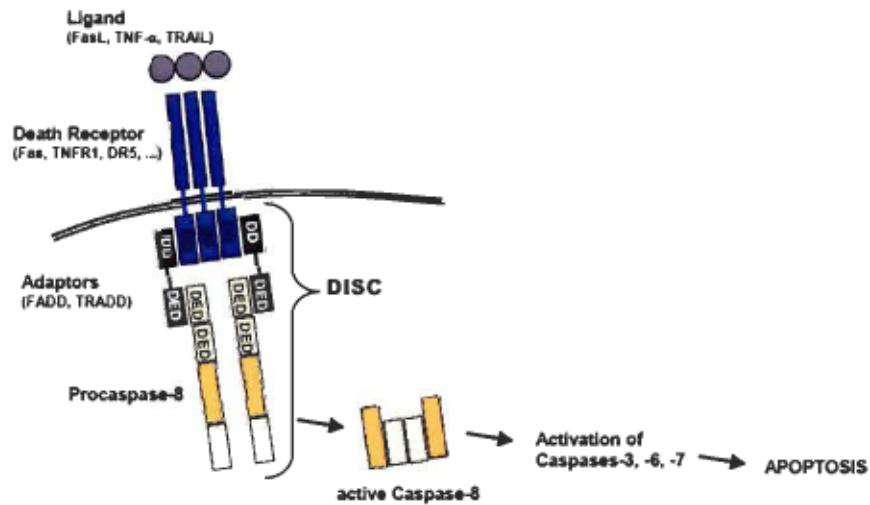


FIGURE 1.15 : Voie extrinsèque de l'apoptose (Andreas Gewies 2003).

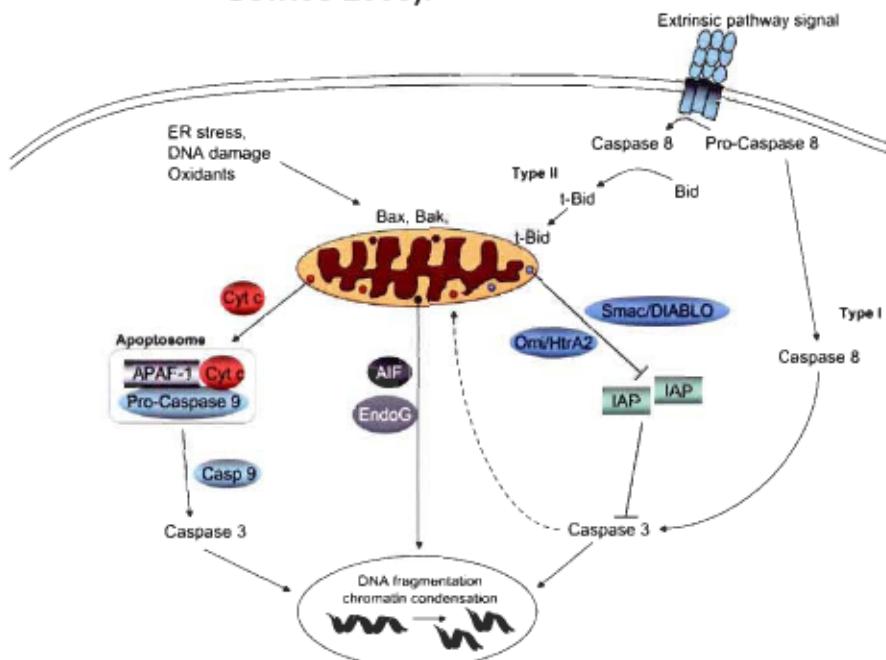


FIGURE 1.16 : Schéma représentant les principales voies d'activation intrinsèque de l'apoptose.

Le stress oxydant active la voie intrinsèque de l'apoptose, qui nécessite l'activation de différentes procaspases et la relâche de facteurs mitochondriaux pro-apoptotiques. La mitochondrie possède un rôle central puisqu'elle effectue l'intégration et la propagation des signaux de mort qui proviennent de l'intérieur

de la cellule, notamment les dommages à l'ADN et le stress oxydant. La voie intrinsèque de l'apoptose est initiée par le changement du potentiel membranaire mitochondrial ce qui induit une augmentation instantanée de la perméabilité membranaire de la mitochondrie et l'ouverture du pore de transition. On observe alors une relâche de protéines pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire de la mitochondrie vers le cytoplasme, notamment le cytochrome c (cyt c), le facteur inducteur d'apoptose (AIF) et Smac/Diablo (figure 1.16). Le cyt c est d'ailleurs impliqué dans la formation de l'apoptosome, un complexe protéique formé des protéines Apaf-1 et cyt c. L'apoptosome provoque la dimérisation de la procaspase-9 et donc l'activation de la caspase-9, l'initiatrice de la cascade des caspases. Lorsque les caspases initiatrices sont activées, elles activent à leur tour les caspases effectrices, soient les caspases-3, -6 et -7 (figure 1.16 et 1.17). L'activation de la cascade des caspases provoque une amplification du signal de mort cellulaire, la fragmentation de l'ADN et éventuellement l'apoptose (Andreas Gewies 2003; Schultz and Harrington, Jr. 2003; Zhang et al. 2004).

La cellule possède un système qui régule l'activation de l'apoptose notamment les protéines de la famille Bcl-2 et les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP). La famille Bcl-2 est reconnue pour son rôle dans le maintien de l'intégrité de la mitochondrie et dans le contrôle de la relâche de protéines de la mitochondrie vers le cytoplasme. Cette famille regroupe différentes protéines qui sont divisées en trois classes selon leur fonction et leur structure. Tout d'abord, il y a le groupe des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 qui empêchent la formation de pores dans la mitochondrie, notamment Bcl-2 et Bcl-x_L. La famille Bcl-2 regroupe également la classe de protéines pro-apoptotiques Bax qui favorisent la perméabilisation de la mitochondrie, soient Bax et Bak. Finalement, il y a le groupe BH3 qui représente des ligands pro-apoptotiques qui contiennent un domaine BH3, tels que Bik, Bad et Bid. Les protéines des groupes Bcl-2 et Bax agissent au niveau de la membrane de la mitochondrie tandis que le groupe BH3 agit comme ligand en se dimérisant avec les protéines ancrées dans la

membrane mitochondriale. Précisément, lors de signaux apoptotiques, les protéines du groupe Bax forment des oligomères, pénètrent la membrane de la mitochondrie pour former des pores et favorisent ainsi la relâche de facteurs pro-apoptotiques dans le cytoplasme. Les protéines du groupe Bcl-2 agissent en empêchant l'oligomérisation des protéines de la classe Bax et prévient ainsi la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Le rôle du groupe BH3 est d'empêcher les protéines du groupe Bcl-2 d'inhiber les protéines pro-apoptotiques du groupe Bax. De plus, les protéines du groupe BH3 favorisent l'oligomérisation des protéines du groupe Bax et donc la perméabilisation de la mitochondrie (figure 1.17) (Andreas Gewies 2003; Zhang et al. 2004).

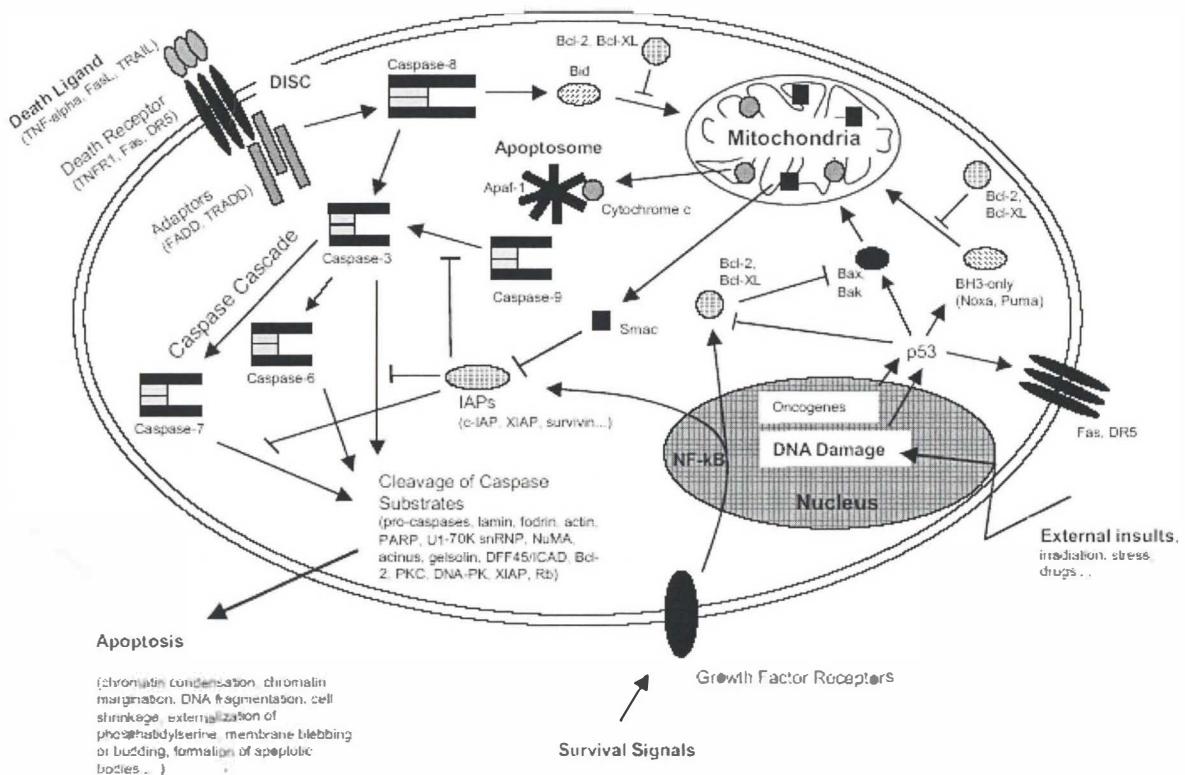


FIGURE 1.17 : Schéma représentant les principales voies de signalisation impliquées dans l'apoptose (Andreas Gewies 2003).

La famille des protéines IAP est également beaucoup reconnue pour son rôle dans la régulation de l'apoptose. Contrairement à la famille des protéines

Bcl-2 qui agissent au niveau de la mitochondrie, les protéines IAP inhibent directement les caspases-3,-7 et -9 (figure 1.17). Cette inhibition s'effectue par une interaction entre le domaine BIR des protéines IAP et le site de clivage de ces caspases (Andreas Gewies 2003; Schultz and Harrington, Jr. 2003; Zhang et al. 2004).

Depuis les dernières années, beaucoup d'études ont été réalisées afin de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la mort cellulaire par apoptose (Andreas Gewies 2003; Schultz and Harrington, Jr. 2003; Zhang et al. 2004). Il est désormais évident que dans des conditions physiologiques ou pathologiques, les voies d'activation de l'apoptose nécessitent l'interaction entre différents familles de protéines, notamment les caspases, la famille Bcl-2 et les IAP. La figure 1.17 représente bien la complexité des voies d'activation de l'apoptose.

1.3.7 Les indices d'apoptose dans la MP

Plusieurs recherches ont montré la présence de marqueurs apoptotiques dans les neurones DAergiques de la pcSN de patients atteints de la MP (Hartmann et al. 2000; Hartmann et al. 2001b; Hartmann et al. 2001a; Mogi et al. 2000; Tatton 2000). Différentes études ont d'ailleurs montré que l'activité des caspases-1, -3, -8 et -9 sont augmentées dans la pcSN de patients atteints de la MP (Hartmann et al. 2000; Hartman et al. 2001b; Mogi et al. 2000; Viswanath et al. 2001). D'autres recherches ont permis d'observer une augmentation de l'expression de la protéine Bax dans la MP (Hartmann et al. 2001a; Tatton 2000), suggérant ainsi que les cellules neuronales meurent par apoptose.

Malgré les résultats de ces différentes études, plusieurs interrogations doivent être élucidées pour affirmer que les neurones meurent par apoptose dans la MP. En effet, la détection de l'apoptose dans la MP s'avère très difficile due à la perte progressive des neurones DAergiques et à l'élimination rapide

des cellules apoptotiques. Néanmoins, l'utilisation de modèles animaux de la MP ont permis de confirmer la présence d'une mort cellulaire par apoptose. De plus, la mort cellulaire par nécrose n'a pas été détectée chez des patients parkinsoniens, supportant ainsi l'hypothèse d'une mort cellulaire par apoptose (Levy et al. 2009).

1.4 MODÈLES DE RECHERCHE POUR L'ÉTUDE DE LA MP

Dans le but d'étudier la MP, plusieurs toxines sont utilisées afin de reproduire la dégénérescence des neurones DAergiques, telles que la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP), le paraquat et la roténone. Il a d'ailleurs été suggéré que toutes ces toxines provoqueraient la production de ROS (Dauer and Przedborski 2003). Néanmoins, seul le MPTP est clairement associé au développement d'une forme humaine de MP. À ce jour, le MPTP est la toxine la plus étudiée puisqu'elle représente un des meilleurs modèles de recherche pour l'étude de la MP (Dauer and Przedborski 2003; Eberhardt and Schulz 2003).

1.4.1 Le MPTP et son métabolite actif, le MPP⁺

Dans les années 1979 à 1982, un syndrome parkinsonien sévère et irréversible a été diagnostiqué chez de jeunes consommateurs de substances illicites en Californie. Ces derniers présentaient symptômes typiques de la MP (tremblement au repos, akinésie et hypertonie) et répondaient bien à la dopathérapie, soit deux éléments caractéristiques de la MP classique. Ce phénomène a rapidement été associé à la consommation d'une préparation intraveineuse de 1-méthyl-4-phényl-4-propionoxypipéridine (MPPP), un analogue du narcotique Demerol. Cette substance était fabriquée illégalement dans un laboratoire et a été contaminée accidentellement par le MPTP. Ce malheureux incident a permis de montrer que le MPTP provoque un syndrome

permanent de MP et justifie donc son utilisation dans les différentes études sur cette maladie (Dauer and Przedborski 2003; Eberhardt and Schulz 2003).

Depuis la découverte du MPTP, de nombreuses recherches ont permis de décrire son métabolisme (figure 1.18) (Dauer and Przedborski 2003; Eberhardt and Schulz 2003; Nicotra and Parvez 2002). Le MPTP est une molécule très lipophile et traverse facilement la barrière hémato-encéphalique (BHE). Une fois dans le cerveau, la toxine est oxydée en 1-méthyl-4-phényl-2,3-dihydropyridinium (MPDP^+) par la monoamine oxydase B (MAO-B) qui est présente uniquement dans les cellules gliales et les neurones sérotonergiques. Le MPDP^+ est ensuite converti en 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP^+), le métabolite actif du MPTP, qui est ensuite relâché dans l'espace extracellulaire selon un mécanisme inconnu. Ce métabolite est polaire et nécessite donc un transporteur membranaire afin de pénétrer dans les cellules. Le MPP^+ possède de grandes affinités avec le transporteur de la DA (DAT) ainsi qu'avec les transporteurs de la sérotonine et de la noradrénaline. Ainsi, le DAT permet la concentration du MPP^+ dans les neurones DAergiques (Dauer and Przedborski 2003; Eberhardt and Schulz 2003).

Le MPP^+ peut prendre différentes voies lorsqu'il se retrouve à l'intérieur du neurone DAergique (figure 1.19). Tout d'abord, il possède une forte affinité pour le VMAT2 et ainsi être transporté à l'intérieur des vésicules synaptiques. Le MPP^+ peut également se concentrer dans la mitochondrie par un mécanisme qui dépend du potentiel transmembranaire mitochondrial. Lorsque la toxine atteint ce site d'action, elle inhibe le complexe I de la mitochondrie et bloque la chaîne de transport des électrons. On observe alors une diminution importante du niveau d'ATP dans la cellule. Le MPP^+ altère donc l'activité mitochondriale ce qui induit une augmentation de la production de ROS. Finalement, le MPP^+ peut demeurer dans le cytosol et interagir avec des enzymes cytosoliques (Dauer and Przedborski 2003; Eberhardt and Schulz 2003; Lotharius and Brundin 2002).

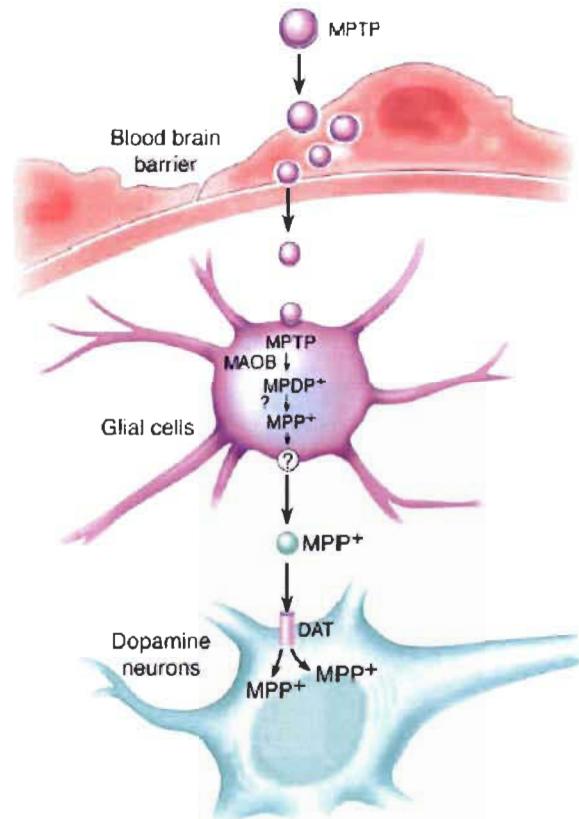


FIGURE 1.18: Métabolisme du MPTP (Dauer and Przedborski 2003).

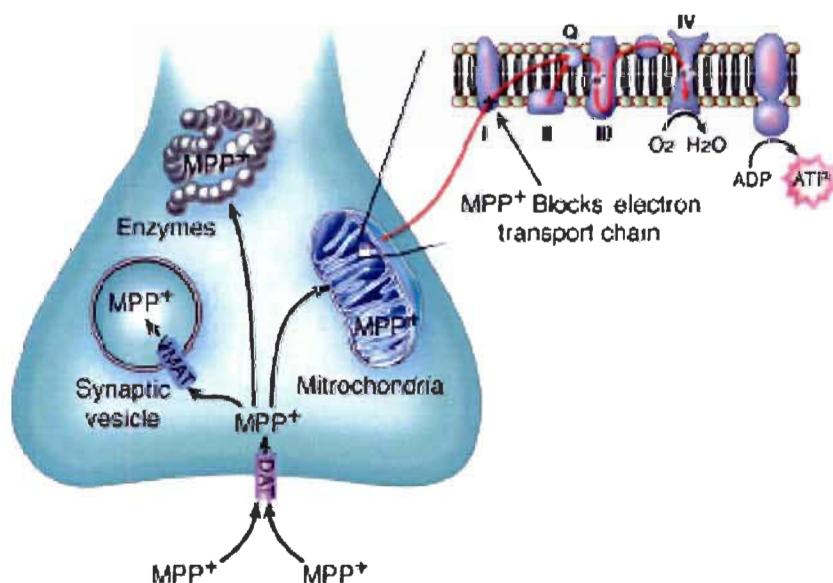


FIGURE 1.19 : Voies intracellulaires du MPP⁺ (Dauer and Przedborski 2003).

Il a été proposé que la toxicité induite par le MPP⁺ soit principalement provoquée par sa capacité à inhiber le complexe I de la mitochondrie. Cette inhibition, qui a pour effets de diminuer fortement la production d'ATP et d'augmenter la production de ROS, provoque la mort des neurones DAergiques (Dauer and Przedborski 2003; Sherer et al. 2002). Il a été établi que de faibles doses de MPP⁺ induisent une mort cellulaire par apoptose, tandis que de fortes doses de cette toxine provoquent une toxicité aigüe et donc la nécrose (Cassarino et al. 1999; Nicotra and Parvez 2002). Ainsi, plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont montré la présence de marqueurs apoptotiques dans les cellules suite à l'utilisation de MPP⁺, tels que la fragmentation de l'ADN, l'activation de caspases et la relâche du cyt c (Cassarino et al. 1999; Eberhardt and Schulz 2003; Nicotra and Parvez 2002). Le MPTP et le MPP⁺ constituent donc de très bons modèles pour l'étude de la MP puisqu'ils reproduisent les signes cliniques et pathologiques caractéristiques de cette maladie.

1.5 TRAITEMENTS DE LA MP

Malgré qu'il soit impossible de guérir la MP, différents traitements pharmacologiques et chirurgicaux sont disponibles afin d'atténuer les symptômes et d'améliorer la qualité de vie des patients. Le traitement de la MP est principalement pharmacologique et vise à rétablir la quantité de DA dans le cerveau ou d'imiter et de prolonger l'action de la DA. Parmi les traitements pharmacologiques, on retrouve la dopathérapie destinée à accroître la quantité de DA dans le cerveau, les agonistes DAergiques qui stimulent les récepteurs DAergiques, les anticholinergiques qui réduisent l'hyperactivité cholinergique ainsi que les inhibiteurs de la MAO-B et de la catéchol-O-méthyl transférase (COM-T) qui empêchent la dégradation périphérique de la L-dopa (Kontakos and Stokes 1999; Schapira 2005; Weintraub et al. 2008b). Il est à noter que la dopathérapie est le traitement le plus efficace et le plus utilisé pour soulager les symptômes moteurs des patients atteints de la MP. À l'échelle

internationale, on évalue que les traitements pharmacologiques pour la MP coûtent à eux seuls 11 milliards \$US par année (Miyasaki et al. 2002). Selon la société Parkinson Canada, on estime qu'il coûte au patient parkinsonien canadien typique environ 1 000 \$ par mois en médicaments.

1.5.1 Les traitements chirurgicaux et la stimulation cérébrale

Les traitements chirurgicaux constituent une autre option thérapeutique pour la MP, notamment la chirurgie ablative, la stimulation cérébrale profonde et la greffe de tissu fœtal. La chirurgie ablative consiste à effectuer une lésion dans un circuit du pallidum (pallidotomie) ou du thalamus (thalamotomie). Cette lésion a pour effet d'imiter l'action de la DA qui, à une concentration normale, module un effet inhibiteur des noyaux gris centraux vers le thalamus. Étant donné qu'un déficit en DA induit une diminution de cette inhibition, une lésion dans ce circuit provoque un arrêt des signaux transmis entre le pallidum et le thalamus. L'objectif de ces chirurgies est donc d'interrompre les voies nerveuses afin de réduire les symptômes moteurs. La thalamotomie vise plus la réduction des tremblements tandis que la pallidotomie permet de diminuer efficacement la bradykinésie et la dyskinésie. La stimulation cérébrale profonde, qui ressemble aux chirurgies ablatives, est également un traitement utilisé. Toutefois, au lieu de créer une lésion, on implante une électrode de stimulation au niveau du thalamus et on le connecte à un générateur d'impulsions électriques de hautes fréquences. Ces impulsions bloquent les voies neuronales qui causent les tremblements. Finalement, des greffes de tissu fœtal ont été réalisées chez quelques patients atteints de la MP. Cette intervention consiste à l'implantation de tissu fœtal pour ainsi rétablir le processus normal de libération de DA. Il est à noter que cette intervention est toujours à un stade expérimental et que les greffes semblent atténuer les symptômes parkinsoniens pendant une courte période (Kontakos and Stokes 1999; Olanow et al. 2000; Weintraub et al. 2008b).

1.5.2 La dopathérapie

La MP étant caractérisée par un important déficit en DA, la dopathérapie vise à rétablir la quantité de DA dans le cerveau. Ce traitement correspond à l'utilisation de L-dopa, le précurseur de la DA. Utilisée depuis plus de 40 ans, la L-dopa est l'agent le plus efficace pour atténuer les symptômes moteurs caractéristiques de la MP. On utilise le précurseur de la DA, soit la L-dopa, car contrairement à la DA, il franchit la BHE. Toutefois, seulement 1 % de la dose de L-dopa ingérée pénètre dans le cerveau puisqu'elle est rapidement décarboxylée à la périphérie en DA (figure 1.20 A) (Hauser 2009). Initialement utilisée seule, la L-dopa est désormais combinée à des inhibiteurs de la dopa-décarboxylase (DDC), une enzyme présente en périphérie et dans le système nerveux central, décarboxylant principalement la L-dopa en DA. Ces inhibiteurs, notamment le carbidopa ou le bensérazide, ne traversent pas la BHE ce qui permet de réduire uniquement la décarboxylation périphérique de la L-dopa et d'augmenter par un facteur de 10 sa biodisponibilité pour le cerveau (figure 1.20 B) (Hauser 2009; Jankovic 2002).

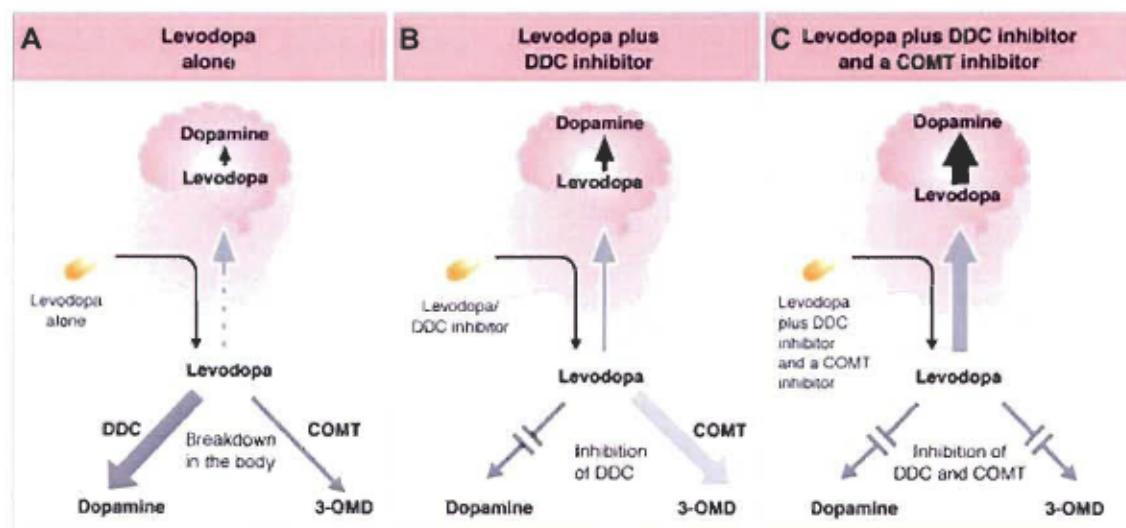


FIGURE 1.20 : Biodisponibilité de L-dopa pour le cerveau suite à différents traitements à la L-dopa. A. L-dopa seule B. L-dopa/inhibiteur de la DDC C. L-dopa/inhibiteurs de la DDC et de la COM-T. (European Parkinson's Disease Association).

L'emploi d'inhibiteur de la DDC permet également de prolonger l'efficacité de la L-dopa et d'augmenter sa tolérance en diminuant les effets secondaires. Lorsqu'administrée conjointement avec un inhibiteur de la DDC, le temps de demi-vie de la L-dopa est de 90 min et sa dose nécessaire est réduite de 60 à 80 %. Le traitement L-dopa/inhibiteur de la DDC peut également être combiné à l'utilisation d'un inhibiteur de la COM-T, une enzyme qui catalyse la dégradation périphérique de la L-dopa et qui induit donc une augmentation de la disponibilité de L-dopa pour le cerveau (figure 1.20 C) (Hauser 2009; Jankovic 2002).

Malgré que les traitements à la L-dopa améliorent les symptômes de la MP, entre 40 et 75 % des patients développent des fluctuations motrices et des dyskinésies après 4 à 6 ans de traitement (Ahlskog and Muenter 2001; Fahn 1999). Ces effets pourraient être provoqués par la perte progressive des neurones DAergiques caractéristique de la MP. En effet, les neurones DAergiques captent la L-dopa qui y est convertie en DA pour ensuite être stockée ou relâchée. À ce jour, aucun traitement ne prévient cette dégénérescence neuronale, il y a donc une diminution constante des neurones DAergiques résiduels. On observe donc une diminution de L-dopa captée par ces neurones et donc une baisse de la capacité de production, de stockage, et de sécrétion de DA (Obeso et al. 2000). Plusieurs études montrent que le développement de dyskinésies pourrait également être induit par une stimulation pulsatile des récepteurs DAergiques. Cette stimulation anormale semble résulter de la concentration variable de DA relâchée dans la fente synaptique (Chase 1998; Obeso et al. 2000; Olanow et al. 2006). La stimulation continue des récepteurs DAergiques ou la prévention de la dégénérescence neuronale sont deux stratégies envisagées afin d'améliorer le traitement de la MP à la L-dopa (Abbruzzese 2008; Hauser 2009; Kedar 2003; Nutt 2008; Schapira 2005).

1.5.3 Les agonistes DAergiques

Les agonistes DAergiques miment l'action DA en agissant directement au niveau des récepteurs DAergiques dans le striatum. Les agonistes DAergiques sont divisés en deux classes, soient les dérivés de l'ergot (bromocriptine, pergolide, lisuride, cabergoline) et les molécules non dérivées de l'ergot (ropinirole, pramipexole, apomorphine, priribedil) (Singh et al. 2007). Ces molécules peuvent être utilisées seules ou combinées avec de la L-dopa afin d'augmenter l'efficacité du traitement. Il a d'ailleurs été montré que l'utilisation des agonistes DAergiques comme traitement initial de la MP tarde de deux à trois ans le début de la consommation de L-dopa (Mandel et al. 2003; Weintraub et al. 2008b). Ces molécules sont caractérisées par un temps de demi-vie plus long que la L-dopa et favorise donc une stimulation plus continue des récepteurs DAergiques. De plus, les agonistes DAergiques induisent moins de complications motrices que la L-dopa. Malgré que ces molécules soient efficaces pour diminuer les symptômes moteurs parkinsoniens, ces molécules induisent des effets secondaires chez les patients. Les troubles du sommeil, l'hypotension, les troubles psychiatriques, les problèmes cardiovasculaires, les dyskinésies en sont quelques exemples (Rezak 2007; Singh et al. 2007; Stocchi 2009).

1.5.4 Les nouvelles avenues thérapeutiques

Présentement, les traitements permettent le contrôle des symptômes moteurs de la MP sans toutefois ralentir ou prévenir sa progression. Il s'avère donc nécessaire de développer des stratégies neuroprotectrices visant à s'opposer à l'évolution des processus neurodégénératifs. Le stress oxydant étant un facteur fréquemment évoqué dans l'étiologie des maladies neurodégénératives, des études se concentrent sur les thérapies préventives, notamment via la consommation de composés antioxydants présents dans notre alimentation (Esposito et al. 2002; Lohle and Reichmann 2010). Parmi ces

stratégies neuroprotectrices, plusieurs antioxydants provenant de l'alimentation sont à l'étude, notamment les vitamines et les polyphénols (Lohle and Reichmann 2010; Mandel et al. 2003; Singh et al. 2007). Une étude a d'ailleurs montré que 63 % des patients atteints de la MP consomment des suppléments nutritionnels (Rajendran et al. 2001).

1.5.4.1 Vitamine E (α -tocophérol)

L' α -tocophérol, la forme la plus active de la vitamine E, est considéré comme un puissant antioxydant reconnu pour son effet protecteur contre la peroxydation lipidique. Les noix, les graines, les huiles végétales sont de bonnes sources de vitamine E. Des études *in vivo* ont d'ailleurs montré que l' α -tocophérol module l'activité des enzymes antioxydantes SOD, CAT et GPx (De Kumar and Rukmimi 1988). D'autres études suggèrent qu'une insuffisance en vitamine E contribue à la dégénérescence neuronale et favorise l'apparition de la MP (Dexter et al. 1994b; Dexter et al. 1994a). Le potentiel de ce composé antioxydant à prévenir ou retarder la progression de la MP suscite donc beaucoup d'intérêt. Ainsi, des études cliniques ont été réalisées dans le but de vérifier si la consommation de suppléments de vitamine E ralentit la progression de cette maladie neurodégénérative. Une importante étude a été effectuée en 1993 afin d'étudier l'effet neuroprotecteur de la sélegiline (déprényl) combinée avec la vitamine E, soit l'étude DATATOP ("Deprenyl and Tocopherol Antioxidant Therapy Of Parkinsonism") (The Parkinson Study Group 1993). La sélegiline est un inhibiteur sélectif de la MAO-B et réduit donc l'oxydation de la DA, une réaction qui produit du H_2O_2 et de l'acide 3,4-dihydrophenylacétique (DOPAC) (équation [1.9]) (Mandel et al. 2003).



Dans le cadre de l'étude DATATOP, le potentiel neuroprotecteur d'un traitement à la sélegiline, à la vitamine E ou à la combinaison de ces deux

composés a été vérifié chez 800 patients atteints de la MP. Ceux-ci étaient évalués à tous les trois mois pour une durée maximale de 24 mois dépendamment de la nécessité d'initier un traitement à la L-dopa. Les résultats obtenus ont montré qu'un traitement à la sélégiline tarde le début du traitement à la L-dopa tandis qu'un traitement à la vitamine E ou une combinaison des deux composés antioxydants ne semblent pas présenter d'effets bénéfiques. Toutefois, ces études ont été réalisées sur des sujets atteints de la MP et donc qui présentaient une importante perte de neurones DAergiques de la pcSN. Plusieurs chercheurs recommandent donc l'étude de la consommation de suppléments de vitamine E à long terme et de façon continue avant que la maladie neurodégénérative se développe pour ainsi montrer l'effet neuroprotecteur de ce composé. (Fariss and Zhang 2003; Gilgun-Sherki et al. 2001; Tanner 1992).

1.5.4.2 Coenzyme Q₁₀

La coenzyme Q₁₀, aussi appelé ubiquinone, est également un puissant antioxydant. En théorie, l'organisme est en mesure de synthétiser la coenzyme Q₁₀ dont il a besoin. Néanmoins, les viandes et les huiles de canola et de soya contiennent une faible quantité de cet antioxydant. Sa structure étant très similaire à la vitamine K, elle agit donc comme une vitamine mais également comme cofacteur essentiel pour la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie (figure 1.9, CoQ). Ainsi, la coenzyme Q₁₀ agit comme antioxydant au niveau de la mitochondrie et des lipides membranaires. Sachant que la mitochondrie possède un rôle pivotant dans le stress oxydant, quelques études suggèrent que la coenzyme Q₁₀ pourrait prévenir les maladies neurodégénératives (Ebadi et al. 2000; Galpern and Cudkowicz 2007; Matthews et al. 1998). Des études ont d'ailleurs montré que le niveau de coenzyme Q₁₀ chez les patients parkinsoniens est plus faible que chez les sujets sains (Galpern and Cudkowicz 2007; Shults et al. 1997). Des résultats prometteurs ont été obtenus chez des modèles *in vivo* de la MP et de la chorée

de Huntington traités avec cet antioxydant, supportant ainsi l'hypothèse qu'il pourrait montrer des effets neuroprotecteurs chez les patients atteints d'une maladie neurodégénérative (Beal et al. 1998; Ferrante et al. 2002; Matthews et al. 1998). Quelques études cliniques ont été réalisées afin d'étudier l'effet neuroprotecteur de la coenzyme Q₁₀ chez des patients atteints de la MP à un stade précoce (Shults et al. 2002). Les résultats obtenus semblent montrer un effet bénéfique d'un traitement avec cet antioxydant. Toutefois, peu d'études cliniques ont été réalisées sur la coenzyme Q₁₀ et il est donc nécessaire d'effectuer des études à grande échelle pour confirmer le potentiel neuroprotecteur de ce composé et déterminer la dose adéquate à utiliser (Galpern and Cudkowicz 2007; Hauser and Zesiewicz 2006; Shults et al. 2004).

1.5.4.3 La multithérapie

Il est de plus en plus évident que la neurodégénérescence dans la MP consiste en un ensemble complexe de réactions qui provoque la mort neuronale. Ceci expliquerait donc pourquoi un seul agent neuroprotecteur serait insuffisant pour prévenir ce processus complexe. Plusieurs suggèrent donc que les futures stratégies neuroprotectrices visant les maladies neurodégénératives devraient utiliser une approche similaire à la multithérapie utilisée dans le traitement du VIH (Mandel et al. 2003). Ainsi, des études affirment qu'une combinaison de différents agents neuroprotecteurs permettrait d'obtenir une meilleure prévention, notamment un mélange de vitamines, de coenzyme Q₁₀, de créatine, de polyphénols et de GSH (Fang et al. 2002; Kedar 2003; Prasad et al. 1999). Il serait également intéressant de combiner le traitement habituel à la L-dopa avec des agents neuroprotecteurs afin de protéger les neurones résiduels (Prasad et al. 1999; Singh et al. 2007).

Néanmoins, le succès des thérapies préventives pour les maladies neurodégénératives reposeraient sur la prise précoce et continue de composés

neuroprotecteurs pour prévenir l'apparition de ces maladies (Esposito et al. 2002; Yacoubian and Standaert 2009).

1.5.4.4 La gourgane

Certaines études suggèrent que la gourgane pourrait avoir un effet thérapeutique chez les patients atteints de la MP (Suchowersky et al. 2006). La gourgane, aussi appelée fève des marais ou *Vicia faba*, est l'une des plus anciennes légumineuses. Cette fève mesure de 15 à 25 cm et est tapissé à l'intérieur d'une couche duveteuse blanchâtre où l'on retrouve 5 à 10 fèves plates qui, selon l'espèce, sont de couleur verte, rougeâtre, brunâtre ou violacée (figure 1.21).



FIGURE 1.21 : La gourgane

Les premiers colons venus d'Europe l'ont transportée pour la semer ici. Sans le savoir, ils bénéficiaient des vertus de cette légumineuse. En effet, la gourgane est riche en protéines, en glucides (principalement en amidon) et en fibres. Faible en matières grasses, elle contient aussi du phosphore, potassium, calcium, magnésium, cuivre, fer, sodium, soufre et les vitamines A, B1, B2 et E (Gendreau et al. 2006).

En 1913, Guggenheim a identifié dans la gourgane la présence de L-dopa, notamment au niveau des fèves, des graines et de la cosse (Longo et al. 1974). Il a d'ailleurs découvert que la cosse de la gourgane semble être plus riche en L-dopa que ses fèves. En 1988, une étude réalisée par Spengos et

Vassilopoulos décrit une amélioration des symptômes moteurs chez des patients parkinsoniens suite à l'ingestion de gourgane (Spengos and Vassilopoulos 1988). En 1993, une autre étude a été effectuée afin de vérifier si la gourgane avait un effet bénéfique sur les troubles moteurs parkinsoniens (Kempster et al. 1993). Ce projet regroupait six patients atteints de la MP avec des fluctuations motrices modérées à sévères. Chaque patient recevait une quantité de fèves de gourgane cuites (100-200g) et une dose de carbidopa (25-50 mg) au lever, suite à un jeûne d'une nuit et un arrêt de leur médication normale au moins 10 h avant l'étude. Dans la majorité des cas, une réponse motrice suite à la consommation de gourgane a été observée. La durée de cette réponse motrice a été d'une moyenne de 285 min avec le traitement à la gourgane comparée à 75 min avec le traitement conventionnel à la lévodopa, tous deux combinés à la carbidopa. Cette longue durée de la réponse motrice observée suite à la consommation de gourgane était corrélée avec une augmentation du taux plasmatique de L-dopa (figure 1.22).

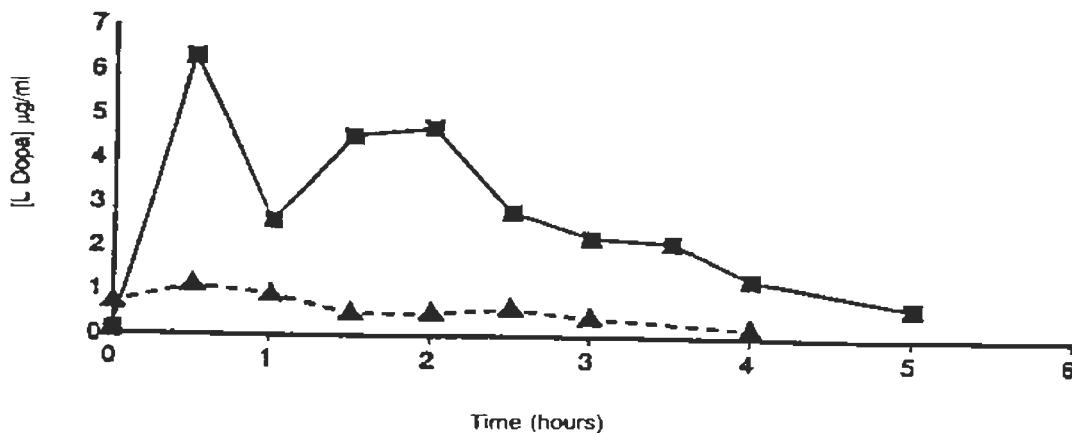


FIGURE 1.22 : Taux plasmatique de L-dopa après ingestion de 200 g de gourgane et 50 mg de carbidopa (■) ou de 100 mg de lévodopa et 25 mg de carbidopa (▲) (Kempster et al. 1993).

Il est à noter que les deux traitements étaient toutefois accompagnés de dyskinésies. Cette étude a donc permis de montrer que la gourgane contient une quantité suffisante de L-dopa pour être considérée pharmacologiquement active. D'autres études ont également obtenu des résultats semblables suite à

l'ingestion de gourgane par des patients parkinsoniens (Apaydin et al. 2000; Rabey et al. 1993).

Afin de mieux comprendre les améliorations motrices observées suite à l'ingestion de gourgane, un nouveau projet de recherche a été réalisé avec certains des patients qui avaient été recrutés dans les études précédentes (Apaydin et al. 2000). Dans le cadre de cette étude clinique, les patients devaient ingérer 250 g de fèves de gourgane cuites au moins deux fois par jour sans modifier leurs habitudes alimentaires et leur médication habituelles. Lors de la première semaine, les patients ont consommé uniquement leur médication et ont dû noter la durée de leurs périodes lorsque les symptômes moteurs sont contrôlés (période "on") et lorsqu'ils ne le sont pas (période "off") ainsi que la durée de leur sommeil. Les patients ont dû effectuer la même chose pour la suite de l'étude, soit pour une période de un à trois mois lors de laquelle ils consommaient de la gourgane en plus de leur médication habituelle (tableau 1.3). Cette étude a également permis de montrer que la consommation de gourgane a un effet bénéfique chez les patients atteints de la MP, notamment en augmentant la durée des périodes "on", et en diminuant la durée des périodes "off" (tableau 1.3).

TABLEAU 1.3
Comparaison de la durée en heure des périodes "on" et "off" ainsi que la durée du sommeil de patients parkinsoniens consommant leur médication habituelle combinée ou non à la consommation de gourgane (Apaydin et al. 2000)

Patients	Médication habituelle			Médication habituelle + gourgane		
	"on" (h)	"off" (h)	Sommeil (h)	"on" (h)	"off" (h)	Sommeil (h)
1	3,5	14,5	5,5	12	3,5	8
2	8	10	6	16	2-3	6
3	6,5	9,5	8	14	2,5	7,5

Ces différentes études suggèrent donc que la consommation de gourgane a un effet bénéfique sur les symptômes moteurs caractéristiques de la MP. Néanmoins, certaines études suggèrent que ces effets ne découleraient pas uniquement de la présence de L-dopa dans la gourgane. Ainsi, les effets bénéfiques observés suite à la consommation de gourgane pourraient possiblement être induits par un synergisme entre la L-dopa et d'autres composés qu'elle contient (Apaydin et al. 2000). Parmi ces composés, la gourgane contient des brassinostéroïdes, notamment le brassinolide, le 24-épibrassinolide et le castastérone (Bajguz and Tretyn 2003).

1.6 LES BRASSINOSTÉROÏDES

Les phytostérols, qui sont caractérisés par leur capacité à neutraliser les radicaux libres, sont des molécules chimiquement semblables aux stéroïdes et sont retrouvées dans différents végétaux. Les brassinostéroïdes (brassinos) sont des phytostérols beaucoup étudiés pour leurs rôles dans le métabolisme des plantes (Clouse 2001; Khrapach et al. 2000; Sasse et al. 1995). Tout comme les auxines, les gibberellines et les cytokinines, les brassinos correspondent à une classe d'hormones végétales. Il est à noter que parmi toutes les hormones retrouvées chez les plantes, les brassinos sont des composés dont la structure est la plus similaire aux stéroïdes (Clouse 2001). Le brassinolide est le composé le plus actif des brassinos et il a été caractérisé en 1979 à l'aide la cristallographie à rayons X. La structure de ces composés est caractérisée par quatre groupes hydroxy et un groupe lactone (figure 1.23 A). Le nom brassinolide dérive d'ailleurs de la combinaison des mots « brassins » pour Brassica (composé isolé pour la 1^{ère} fois de cette plante) et « olide » pour lactone (Bajguz and Tretyn 2003).

Depuis la découverte du brassinolide, on dénombre au moins 50 brassinos naturels retrouvés dans environ 60 espèces de plantes différentes. Malgré que la concentration des brassinos varie selon l'espèce et l'âge de la plante, on

retrouve ces composés dans toutes les parties de la plante. Les concentrations les plus élevées de brassinos se situent au niveau des organes reproductifs et les tissus en croissance, tels que le pollen et les graines immatures. Ainsi, les jeunes pousses contiennent des niveaux plus élevés de ces hormones de croissance comparativement aux plantes matures (Bajguz and Tretyn 2003).

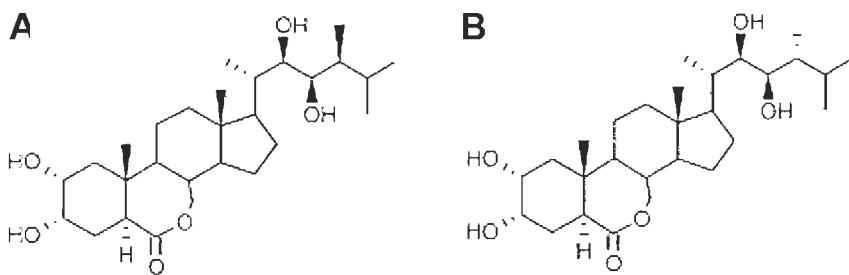


FIGURE 1.23 : A. Structure du brassinolide B. Structure du 24-épi (Bajguz and Tretyn 2003).

En plus de leurs effets bénéfiques sur la croissance et le développement des plantes, les brassinos possèdent de nombreux effets biologiques. Il a été montré que les brassinos augmentent la tolérance des plantes contre différentes maladies. De plus, une étude réalisée en 1998 a identifié pour la première fois une activité anti-virale chez cette classe d'hormones (Bobrick et al. 1998). Les brassinos sont également reconnus pour leur capacité à protéger les plantes de différents stress environnementaux, notamment les températures extrêmes, le stress salin, la sécheresse et les différents pathogènes. Ces conditions de stress favorisent le développement d'un état de stress oxydant. En effet, tout comme chez l'humain, les ROS possèdent également un rôle primordial chez les plantes et interviennent dans la croissance et le développement. Il y a donc une production constante de ROS qui est contrôlée par divers mécanismes antioxydants. Lorsque les plantes sont soumises à des stress environnementaux, il y a une surproduction de ROS, notamment les radicaux $O_2^{.-}$ et OH^{\cdot} ainsi que le H_2O_2 . Il a été montré que les brassinos augmentent les défenses antioxydantes des plantes, plus particulièrement par la modulation à la hausse des défenses antioxydantes enzymatiques (SOD, CAT, GPx) et non-enzymatiques (Bajguz and Hayat 2009; Krishna 2003). Les brassinos possèdent

donc plusieurs rôles chez les plantes et certains ne sont pas encore parfaitement compris.

À ce jour, les effets des brassinos sont peu connus chez les mammifères. Certaines études ont montré que des brassinos naturels, à faible concentration, peuvent inhiber la croissance de cellules cancéreuses sans affecter la croissance des cellules normales (Malikova et al. 2008). Une activité anti-virale a également été identifiée chez différents brassinos naturels et leurs analogues (Castilla et al. 2005; Michelini et al. 2004; Wachsman et al. 2004). Les effets des brassinos contre le stress oxydant chez les mammifères ne semblent pas avoir été étudiés.

1.6.1 Le 24-épibrassinolide (24-épi)

Les brassinos sont présents en faible quantité dans les plantes, soit à une concentration d'environ 1 pmol/g, et la synthèse chimique s'avère un processus laborieux. Le 24-épi (figure 1.23 B), un composé retrouvé dans la gourgane, est abondamment étudié puisqu'il est le seul brassino naturel disponible commercialement de par son utilisation importante en agriculture (Malikova et al. 2008). En effet, le 24-épi est reconnu pour ses effets sur l'amélioration de la germination et la croissance des semences. Différentes études ont également montré que ce brassino module les enzymes antioxydantes, notamment chez les végétaux subissant des stress environnementaux (Ali et al. 2008; Bajguz and Hayat 2009; Sasse et al. 1995; Singh and Shono 2003). Le 24-épi agit donc en augmentant la résistance des plantes face aux différents stress environnementaux.

Chez les mammifères, les effets du 24-épi commencent à être étudiés. Une étude a d'ailleurs montré les propriétés anti-cancer du 24-épi (Malikova et al. 2008). Des analyses ont également prouvé que le 24-épi n'est pas toxique pour les mammifères. En effet, ces études ont analysé sa dose létale 50 (DL50),

qui correspond à la dose pouvant causer la mort de 50 % d'une population animale dans des conditions expérimentales précises. Ainsi, la DL50 orale chez les souris (femelles) correspond à une dose d'au moins 1 000 mg/kg tandis que la DL50 orale et cutanée est d'au moins 2 000 mg/kg chez les rats (mâles et femelles). De plus, à une concentration de 0,2 %, le 24-épi n'irrite pas les yeux et la peau des lapins. D'autres études ont montré que le 24-épi n'induit aucune mutation spontanée. Ainsi, la toxicité du 24-épi est extrêmement faible (Ikekawa and Zhao 1991; Khripach et al. 2000).

1.7 OBJECTIFS DE RECHERCHE

Plusieurs Canadiens sont atteints de la MP et ce nombre augmente selon le rythme du vieillissement de la population (Kontakos and Stokes 1999). En effet, cette maladie est une affection neurodégénérative progressive qui est généralement observée après la cinquantaine et dont la cause demeure à ce jour encore inconnue. Malgré qu'il n'existe actuellement aucun traitement curatif de la maladie, différents traitements pharmacologiques et thérapeutiques aident à maîtriser les symptômes et ainsi améliorer la qualité de vie des patients.

Le stress oxydant, qui est un facteur fréquemment évoqué dans l'étiologie de la MP, résulte d'une surproduction d'oxydants qui excède le potentiel antioxydant de la cellule et cette accumulation provoquerait la mort des neurones DAergiques. Depuis plusieurs années, les recherches sur les molécules antioxydantes qui ont la capacité de neutraliser le surplus d'oxydants sont de plus en plus nombreuses. Notre laboratoire se spécialise sur l'étude du potentiel neuroprotecteur des phytostérols, des molécules chimiquement semblables aux stéroïdes présentes dans différents végétaux. Certains de ces composés naturels s'avèrent très intéressants à étudier car ils sont caractérisés par une forte capacité à neutraliser les radicaux libres.

Dans ce cadre conceptuel, mon projet de recherche se concentre sur l'étude du potentiel neuroprotecteur du 24-épi, un brassino beaucoup étudié pour sa capacité à protéger les plantes de différents stress environnementaux. À ce jour, les effets bénéfiques de la gourgane sont justifiés par son contenu en L-dopa. Nos recherches permettraient donc de montrer que les effets de cette fève pourraient plutôt être dus au synergisme de la L-dopa avec d'autres composés naturels qu'elle contient, comme le 24-épi.

L'étude des effets neuroprotecteurs du 24-épi sur des neurones DAergiques en état de stress oxydant constitue l'objectif principal de mon projet de maîtrise. Tout d'abord, les effets antioxydants de ce brassino ont été étudiés, plus particulièrement la capacité du 24-épi à contrôler la production de ROS et à moduler l'activité de trois enzymes antioxydantes, la SOD, la CAT et la GPx. Ensuite, le potentiel anti-apoptotique du 24-épi a été vérifié, notamment par l'étude de la fragmentation de l'ADN, de l'activation de la caspase-3 et de la modulation de l'expression des protéines Bax (pro-apoptotique) et Bcl-2 (anti-apoptotique).

Ce projet de recherche permettra donc d'approfondir nos connaissances sur les effets des brassinos contre le stress oxydant chez les mammifères et ainsi mener à long terme au développement d'une thérapie préventive visant la prévention de la neurodégénérescence.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cette section a pour objectif de décrire plus spécifiquement certaines techniques expérimentales utilisées dans le cadre du travail de recherche présenté dans l'article scientifique (chapitre III).

2.1 MATÉRIEL

Tous les réactifs proviennent de chez Sigma (St-Louis, MO) sauf si indications contraires.

2.2 CULTURE CELLULAIRE

2.2.1 Modèle cellulaire

Les recherches sur le potentiel neuroprotecteur du 24-épi ont été réalisées sur les cellules PC12 (American Type Culture Collection, ATCC), une lignée cellulaire provenant d'un phéochromocytome de la surrénale de rat. Ces cellules sont caractérisées par leur capacité à synthétiser, à emmagasiner et à relâcher une quantité considérable de catécholamines, principalement de la DA et de la noradrénaline. Par sa particularité à très bien réagir au facteur de croissance neuronale (NGF), la lignée cellulaire PC12 est largement utilisée comme modèle pour l'étude de la différenciation neuronale. En effet, après quelques jours d'exposition au NGF, les cellules PC12 subissent un changement phénotypique (figure 2.1) et acquièrent différentes propriétés caractéristiques des neurones sympathiques. Ainsi, des traitements au NGF induisent l'arrêt de la division des PC12, le développement de neurites et la production de neurofilaments. Les cellules deviennent également excitables, synthétisent principalement de la DA, expriment le DAT, les récepteurs estrogéniques (ER)

alpha et bêta ainsi que différentes enzymes impliquées dans le métabolisme des catécholamines (Greene and Rein 1977; Greene and Tischler 1976).

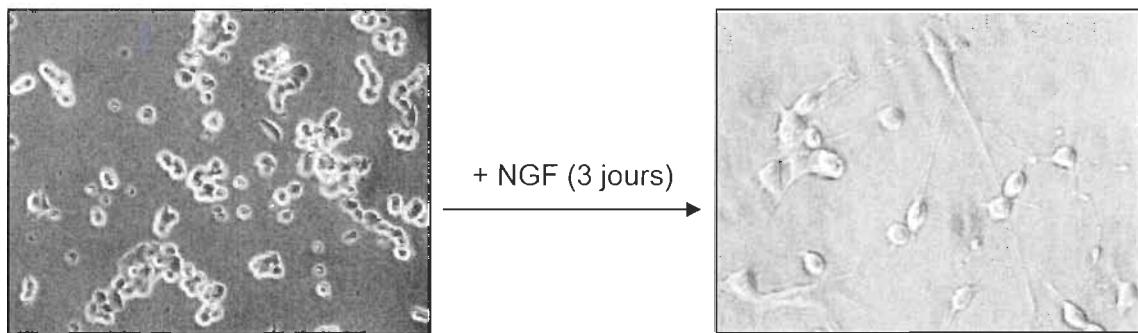


FIGURE 2.1 : Cellules PC12 différencierées (droite) suite à un traitement au NGF pendant 3 jours de cellules PC12 non-différencierées (gauche).

Les PC12 sont conservées dans un incubateur à une température de 37 °C sous une atmosphère humide à 5 % de CO₂. Les cellules PC12 non différencierées sont cultivées dans un milieu de routine formé de 85 % de RPMI 1640 sans rouge phénol, 10 % de sérum de cheval (HS) et 5 % de sérum bovin fœtal (FBS). Le milieu de culture est changé à tous les deux jours. Les cellules utilisées pour étudier les effets neuroprotecteurs du 24-épi ont été différencierées trois jours dans un milieu composé de 99 % de RPMI 1640 sans rouge phénol, 1% de FBS et 50 ng/mL de NGF. Ce milieu est aussi changé tous les deux jours (Greene et al. 1987). Il est à noter que le pH des milieux de culture est contrôlé et correspond au pH physiologique (7.2 à 7.4).

2.2.2 Traitement des cellules PC12 différencierées

Les traitements ont été effectués suite à la différenciation de trois jours des cellules PC12. Les cellules ont tout d'abord été pré-traitées pendant trois heures avec une solution de 24-épi 1 nM qui a été préparée avant l'exécution de chaque traitement. Les PC12 ont ensuite été traitées pendant 24 h avec la neurotoxine, soit avec une solution de MPP⁺ 5 mM fraîchement préparée (figure 2.2). Il est à noter qu'une concentration de MPP⁺ de 500 µM a

été utilisée lors des études du potentiel anti-apoptotique du 24-épi afin d'observer un taux maximal de cellules PC12 en processus apoptotiques après 24 h de traitement (Bournival et al. 2009; Nicotra and Parvez 2002). Le milieu de traitement utilisé contient 99 % de milieu RPMI 1640 sans rouge phénol et 1 % de FBS « strippé ». Le caractère « strippé » signifie que les stéroïdes ont été éliminés du milieu à l'aide d'une filtration au charbon.

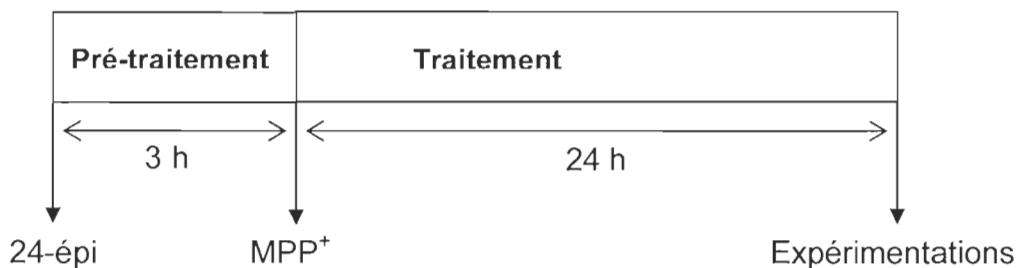


FIGURE 2.2 : Schéma illustrant la procédure pour les traitements des cellules PC12 neuronales.

2.3 DÉTECTION DES SUBSTANCES OXYGÉNÉES RÉACTIVES (ROS)

La capacité du 24-épi à neutraliser les radicaux libres générés par le MPP⁺ a été examinée à l'aide de la dihydrorhodamine 123 (DHR) et le MitoSOX™ Red (Invitrogen, Toronto). La DHR est une molécule qui, en présence des radicaux libres OH[·], NO₂[·], H₂O₂, CO₃²⁻, HOCl et ONOO[·], est oxydée en rhodamine 123, un composé très fluorescent (figure 2.3) (Wardman 2007; Wrona et al. 2005).

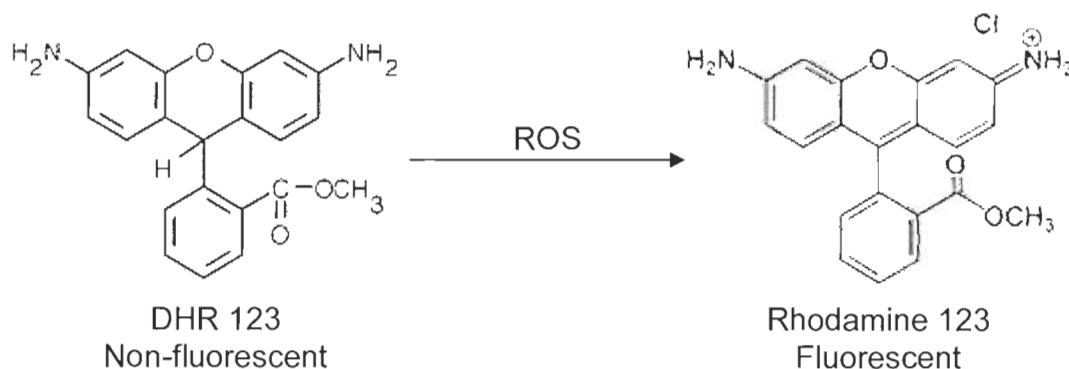


FIGURE 2.3 : Oxydation de la DHR 123 en Rhodamine 123 par les ROS.

Cette technique a été complétée à l'aide du MitoSOX™ Red dans le but de détecter spécifiquement l'anion superoxyde (O_2^-), un radical libre qui est hautement réactif. Ce composé est non-fluorescent et a la capacité de pénétrer dans les cellules vivantes et de se loger dans la mitochondrie, soit le lieu principal de production de radicaux O_2^- . Une fois dans la mitochondrie, le MitoSOX™ Red est oxydé par les O_2^- et émet de la fluorescence. Une particularité très intéressante de ce composé est qu'il réagit fortement et spécifiquement avec les O_2^- , cette réaction n'étant pas observée avec les autres ROS. Les expérimentations ont été effectuées selon le protocole suggéré par la compagnie.

2.4 DÉTECTION DES CELLULES APOPTOTIQUES PAR LE MARQUAGE TUNEL ET PAR L'IMMUNOFLUORESCENCE DE LA CASPASE-3 ACTIVÉE

Dans le but de déterminer l'effet du 24-épi sur l'apoptose induite par le MPP⁺, le marquage TUNEL ("Transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling") a été combiné à la détection par immunofluorescence de la caspase-3 activée. La technique TUNEL consiste en un marquage des extrémités 3'OH libres des fragments d'ADN avec des dUTPs liés à la fluorescéine par l'enzyme transférase de déoxynucléotides terminaux (Tdt) (Gavrieli et al. 1992; Sgond and Gruber 1998). Ainsi, les fragments d'ADN sont facilement observables à l'aide d'un microscope à fluorescence en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 450 nm et d'émission de 515 nm.

La mesure de l'apoptose a été complétée par la détection par immunofluorescence de la caspase-3 activée, une protéase qui possède un rôle essentiel dans l'apoptose (Porter and Janicke 1999). Donc, la présence de caspase-3 clivée combinée au marquage TUNEL permet d'identifier spécifiquement les cellules en apoptose. Afin de détecter la caspase-3 activée, un anticorps primaire anti-caspase 3 clivée qui reconnaît un acide aminé présent uniquement lorsque la caspase est clivée a été utilisé selon une

technique décrite précédemment (Bournival et al. 2009). Un anticorps secondaire lié au fluorochrome cyanine 3 (Cy3) a ensuite été employé afin de visualiser l'activation de cette caspase par microscopie à fluorescence.

Un inhibiteur du clivage de la caspase-3 a également été utilisé pour montrer que l'apoptose induite par le MPP⁺ impliquait le clivage de la caspase-3. Cet inhibiteur permet également d'observer la spécificité des techniques utilisées, c'est-à-dire l'absence de marquage TUNEL ou de détection de caspase-3 clivée en présence de cet inhibiteur. Il existe différents inhibiteurs synthétiques du clivage de la caspase-3 et il est donc essentiel de sélectionner un inhibiteur selon le modèle cellulaire utilisé et les effets que l'on désire observer. Tout d'abord, le mécanisme d'action des inhibiteurs est développé en fonction du site de clivage des caspases. Ainsi, ces inhibiteurs, qui sont en partie formés de peptides, sont des pseudo-substrats pour les caspases activées et agissent donc en inhibiteurs compétitifs. Le mécanisme d'action de ces inhibiteurs est également déterminé par le groupement chimique auquel les peptides sont liés. Ainsi, la liaison des peptides appropriés à un groupement de fluorocétones (-FMK) ou de chlorométhyl cétone (-CMK) induit une inhibition compétitive irréversible tandis qu'une liaison à un groupement aldéhyde (-CHO) provoque une inhibition compétitive réversible. Il est important de noter que de nombreux inhibiteurs synthétiques de l'activation des caspases sont hydrophobes et donc traversent très faiblement la membrane cellulaire. Par contre, il a été montré que les inhibiteurs des caspases qui possèdent un groupement -FMK dans leur structure sont beaucoup plus perméables que les inhibiteurs qui possèdent un groupement -CHO. De plus, il est possible d'ajouter un groupement phén oxy (OPh) à l'extrémité carboxy-terminale de l'inhibiteur combiné à l'ajout d'un groupe quinolyl (Q) à l'extrémité amino-terminale pour ainsi augmenter significativement la perméabilité des inhibiteurs. L'estérification des résidus d'acide aspartique (OMe) augmente également la perméabilité cellulaire des inhibiteurs (Callus and Vaux 2007; Ekert et al. 1999). À l'aide de ces informations techniques, un inhibiteur spécifique du clivage de la

caspase-3 perméable dont la séquence est le Z-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-DL-Asp(Ome)-FMK ou Z-DEVD-FMK a été sélectionné. Il a d'ailleurs été montré que cet inhibiteur est très efficace contre l'apoptose induite dans un modèle de cellules PC12 (Fujita et al. 2006; Gao et al. 2005).

Finalement, les noyaux ont été mis en évidence à l'aide du 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Le DAPI est une molécule fluorescente qui traverse facilement la membrane cellulaire et qui s'insère entre les adénines et les thymines de l'ADN. Lorsque le DAPI est excité par la lumière ultraviolette, il émet une fluorescence bleue. En résumé, la détection des cellules apoptotiques par microscopie à fluorescence a été réalisée via trois marquages spécifiques, soient le marquage de la fragmentation de l'ADN par la technique TUNEL, le marquage de la caspase-3 activée par immunofluorescence ainsi que le marquage des noyaux totaux avec le DAPI.

2.4.1 Traitement des cellules PC12 différencierées pour la détection de l'apoptose par microscopie à fluorescence

Pour les conditions identiques aux techniques mentionnées précédemment, les traitements ont été effectués selon aux indications de la section 2.2.2., à l'exception que les cellules ont été cultivées sur des lamelles recouvertes de collagène (Fisher Scientific, Ottawa, Canada) dans des plaques de 24 trous. De plus, puisque cette technique est caractérisée par l'utilisation d'un inhibiteur de l'activation de la caspase-3, deux conditions supplémentaires ont été ajoutées et celles-ci ont nécessité des traitements légèrement différents. Ces conditions additionnelles ont permis d'observer l'effet de l'inhibition du clivage de la caspase-3 sur l'apoptose induite par le MPP⁺. Ainsi, suite à la différenciation de trois jours des cellules PC12, 1,25 µL d'une solution de Z-DEVD-FMK 20 mM (Bachem, Torrance, CA) a été ajoutée dans le milieu de culture pour obtenir une concentration finale d'inhibiteur de 50 µM. Ce pré-traitement a lieu 1 h avant le traitement pour une période de 24 h avec la solution de MPP⁺ 500 µM fraîchement préparée (figure 2.4).

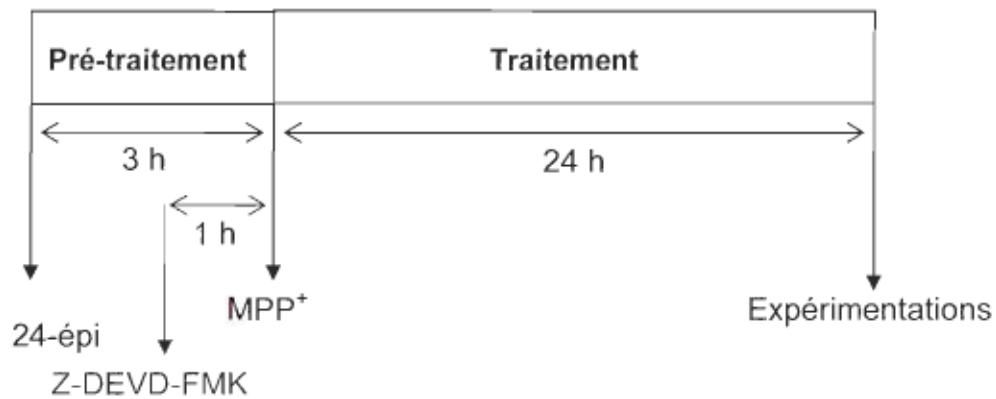


FIGURE 2.4 : Schéma illustrant la procédure pour les traitements des cellules PC12 neuronales avec un inhibiteur du clivage de la caspase-3 (Z-DEVD-FMK).

CHAPITRE III

ARTICLE SCIENTIFIQUE

3.1 MA CONTRIBUTION SPÉCIFIQUE AINSI QUE CELLE DES COAUTEURS AU TRAVAIL DE RECHERCHE PRÉSENTÉ DANS L'ARTICLE

Dans le cadre de mes études de maîtrise en biophysique et biologie cellulaires, j'ai effectué les recherches, les manipulations ainsi que les mises au point des techniques de la majeure partie des résultats traitant du potentiel antioxydant et anti-apoptotique du 24-épi qui sont présentés dans l'article : "24-Epibrassinolide, a phytosterol from the brassinosteroid family, protects dopaminergic cells against MPP⁺-induced cellular death by modulating apoptosis and antioxidative enzymes". Cet article a été soumis au journal "Free Radical Biology & Medicine" en juillet 2010.

Ma contribution spécifique à cet article scientifique correspond aux résultats décrits dans les figures 4 à 7 tandis que les figures 1 à 3 sont les résultats du travail de recherche de Fanny Longpré, assistante de recherche au laboratoire de recherche en neurobiologie cellulaire. J'ai également rédigé les sections matériel et méthode et résultats. De plus, j'ai élaboré les figures et rédigé leurs descriptions.

3.2 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

Le stress oxydant et l'apoptose sont des facteurs fréquemment évoqués afin d'expliquer la destruction des neurones dans différentes maladies neurodégénératives, notamment la MP. Dans le but de reproduire cet état de stress oxydant menant à l'apoptose dans les neurones DAergiques, la neurotoxine MPP⁺ est fréquemment utilisée dans les modèles d'études *in vitro* et *in vivo* de la MP. Les brassinos sont des phytostérols étudiés pour leurs rôles dans le métabolisme des plantes, notamment leurs effets protecteurs contre différents stress environnementaux. Cependant, leurs effets protecteurs contre le stress oxydant chez les mammifères n'ont jamais été investigués. Dans cette étude, nous avons évalué la capacité du 24-épi, un brassino présent dans la gourgane, à protéger les cellules PC12 neuronales du stress oxydant et de l'apoptose induits par la toxine MPP⁺. Nos résultats montrent que le 24-épi protège les cellules PC12 neuronales de la cytotoxicité induite par le MPP⁺. En effet, les tests de la DHR 123 et de MitoSox™ ont permis de confirmer que le 24-épi a la capacité de diminuer le niveau intracellulaire ROS. De plus, nos recherches ont également permis d'observer que cette baisse de ROS par le 24-épi est induite par la capacité de ce brassino à moduler l'activité des enzymes antioxydantes SOD, CAT et GPx. Finalement, cette étude a permis de montrer que les effets antioxydants du 24-épi inhibent l'apoptose induite par le MPP⁺, notamment en diminuant la fragmentation de l'ADN, l'activation de la caspase-3 et en diminuant le ratio de l'expression des protéines Bax/Bcl-2. Par le biais de cette recherche, nous avons montré pour la première fois le potentiel antioxydant et neuroprotecteur du 24-épi contre le stress oxydant induit dans une ligné de cellules DAergiques de mammifère.

3.3 ARTICLE

24-Epibrassinolide, a phytosterol from the brassinosteroid family, protects dopaminergic cells against MPP⁺-induced cellular death by modulating apoptosis and antioxidative enzymes.

Julie Carange¹, Fanny Longpré¹, Benoit Daoust¹, and Maria-Grazia Martinoli^{1,2,*}.

1: Dept of Biochemistry, Neurosciences Research Group, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351 Boulevard des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7.

2: Neuroscience Research Unit, Centre de Recherche de l'Université Laval, Ste-Foy, Québec, G1V 4G2, Canada.

Corresponding author:

Maria-Grazia Martinoli, Ph.D.

Dept. of Biochemistry

Université du Québec

Trois-Rivières, Qc., G9A 5H7, Canada

Tel. 819-376-5011 ext.3994

Fax 819-376-5084

e-mail: martinol@uqtr.ca

Running title: Brassinosteroids protect against oxidative stress

Abbreviations: 24-Epi, 24-epibrassinolide, BR, Brassinosteroid, CAT, catalase, DA, dopamine, DAergic, dopaminergic, DDC, N,N-diethyldithiocarbamate, DHR, dihydrorhodamine 123, FBS, fetal bovine serum, GPx, glutathione peroxidase, L-dopa, L-3,4-dihydroxyphenylalanine, LDH, lactate dehydrogenase, MPP+, 1-methyl-4-phenylpyridinium, MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, NGF, nerve growth factor, PD, Parkinson's disease, ROS, reactive oxygen species, RT, room temperature, SNpc, substantia nigra pars compacta, SOD, superoxide dismutase, ssDNA, single stranded DNA, TH, tyrosine hydroxylase.

Abstract

Oxidative stress and apoptosis are frequently suggested to explain the damage of neuronal cells in various neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease (PD). 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP^+) is a neurotoxin known to induce oxidative stress and apoptosis of dopaminergic (DAergic) neurons, as observed in parkinsonian brains.

Brassinosteroids (BRs) are phytosterols recognized to promote stress tolerance of vegetables via the modulation of the antioxidative enzymes cascade; however, their antioxidative effects on mammalian neuronal cells have never been examined so far. In this study, we investigate the ability of 24-epibrassinolide (24-Epi), a natural BR, to protect neuronal PC12 cells from MPP^+ -induced oxidative stress and apoptosis. Our results show that 24-Epi protects neuronal PC12 cells from MPP^+ -induced damages. In particular, 24-Epi reduces the level of intracellular reactive oxygen species (ROS), $ONOO^-$, H_2O_2 , HOCl and O_2^- , as detected by dihydrorhodamine (DHR) 123 and MitoSOX™ Red. We also demonstrated that the reduction of ROS by 24-Epi is mediated through the modulation of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) activities. Finally, we demonstrated that the antioxidative properties of 24-Epi lead to the inhibition of MPP^+ -induced apoptosis of neuronal PC12 cells by reducing DNA fragmentation as well as Bax/Bcl-2 protein ratio and cleaved caspase-3. This is the first time that the potent antioxidant and neuroprotective role of a BR, 24-Epi, is established in a mammalian DAergic cell line.

Introduction

PD is characterized by the selective degeneration of the nigrostriatal DAergic neurons, leading to a depletion of dopamine (DA) (Dauer and Przedborski 2003). The etiology of PD is not completely clear but several studies have demonstrated that, in post mortem samples of substantia nigra pars compacta (SNpc), dopaminergic neurons exhibit markers of oxidative stress such as lipid peroxidation, DNA oxidative damage, and carbonyl modifications of soluble proteins (Olanow 2007; Zhou et al. 2008). PD brain is also characterized by oxidative damaged and functionally impaired and misassembled mitochondrial complex I, which strengthened the implication of oxidative stress in the pathophysiology of PD (Keeney et al. 2006). Indeed, Mn-dependant SOD level and activity are increased in PD brains (Zhou et al. 2008; Navarro et al. 2009).

Further evidence for the role of oxidative stress in PD comes from studies with the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). MPTP has been widely used as a DAergic neurotoxin because it causes a severe PD-like syndrome in humans as well as in monkeys and mice (Calon et al. 2001). Its administration to C57BL mice leads to a decline of striatal DA and tyrosine hydroxylase (TH) levels in the SNpc (Jakowec et al. 2004; Blanchet et al. 2008) as well as the death of DAergic neurons (Dauer and Przedborski 2003). MPTP crosses the blood-brain barrier and is converted into its toxic metabolite MPP⁺ in astrocytes by the enzyme monoamine oxidase B. MPP⁺ is then selectively taken up by dopaminergic neurons via the high-affinity DA transporter and is actively transported into mitochondria where it interferes with mitochondrial activity through inhibition of complex I (Mizuno et al. 1987; Przedborski et al. 2004; Schober 2004). This results in the increased level of ROS and increased activity of SOD, CAT and GPx in MPTP-treated mice and MPP⁺-treated neuronal cells (Cassarino et al. 1997; Lahaie-Collins et al. 2008; Thomas et al. 2008). Then, MPTP and its active metabolite MPP⁺ induce the formation of peroxynitrite associated with degeneration of DAergic neurons (Ara et al. 1998). On the other side, H₂O₂, O₂^{•-} and •OH have been detected following complex I inhibition with

MPP⁺ (Adams et al. 1993). In addition, the inhibition of complex I and subsequent oxidative stress induced by the administration of MPP⁺ leads to neuronal cell death by apoptosis (Hartley et al. 1994; Shang et al. 2004).

On the other side, BRs are phytosterols found in several vegetables including *Vicia faba* (broad bean) seed and pollen (Park et al. 1987; Ikekawa et al. 1988; Gamoh et al. 1989). They are currently intensively studied to understand their role in plant metabolism (Khripach et al. 1999). Their main physiological effects in plants include actions on hormonal balance, activation of protein and nucleic acid synthesis, enzyme activity, growth promotion, size and quantity of fruits increase, and, most interestingly, increased resistance to unfavorable environmental factors, stress and disease (for review see Khripach et al. 2000). It was also shown that exogenous application of natural BRs to other vegetables has a specific antioxidative effect. The natural BR, 24-Epi, found in *Vicia faba* (Ikekawa et al. 1988), increases the activity of enzymatic antioxidants SOD, CAT and peroxidase in *Lycopersicon esculentum* (tomato) leaves and *Brassica juncea* L. (Indian mustard) plant (Mazorra et al. 2002; Ali et al. 2008). 24-Epi also reduces lipid peroxidation in *Oryza sativa* L. (rice) and Indian mustard plants (Özdemir et al. 2004; Ali et al. 2008).

The antioxidative properties of BRs, clearly demonstrated in vegetables, strongly suggest that these compounds may exert an antioxidant and possibly neuroprotective role in mammals, as recently reported for other natural molecules (see for review Calabrese et al. 2003; Anekonda 2006; Baur and Sinclair 2006; Lahaie-Collins et al. 2008; Singh et al. 2008; Alcain and Villalba 2009; Pandey and Rizvi 2009; Baur 2010; Iriti et al. 2010). Indeed, in mammals, the effects of BRs are just starting to be elucidated. BRs are reported to have anticancer and antiproliferative activity on human cell lines (Wu and Lou 2007; Malikova et al. 2008; Slavikova et al. 2008; Hamdy et al. 2009). Antiviral activity has also been identified in natural BRs and synthetic analogs (Ramirez et al. 2000; Michelini et al. 2004; Wachsman et al. 2004).

Moreover, beans from *Vicia faba* also contain L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) (Farina et al. 1974; Rabey et al. 1993), the amino acid precursor of DA, which is nowadays the most effective symptomatic treatment for PD (LeWitt 2009). Clinical reports show that the consumption of *Vicia faba* has beneficial effects on PD patients (Apaydin et al. 2000; Raguthu et al. 2009). However, the concentrations of L-dopa in *Vicia faba* are not sufficient to explain the magnitude of the responses observed in PD patients and raise the possibility that other compounds from *Vicia faba*, such as BRs, may complement the effect of L-dopa by their antioxidative activities.

Following this line of evidences, the aim of our present study was to examine in details the effect of 24-Epi, a BR present in *Vicia faba*, on MPP⁺-induced oxidative stress in a well known cellular model of PD, NGF-differentiated PC12 (Greene and Tischler 1976; Ryu et al. 2005). We showed that 24-Epi reduces apoptotic cellular death as well as protein markers of apoptosis, modulate activities of SOD, CAT and GPx and decreases intracellular concentration of ROS. Overall, our findings clearly demonstrate that 24-Epi is a new efficient protective molecule against MPP⁺-induced oxidative stress and thus it might be regarded as a novel molecule in complementary and/or preventive therapies for neurodegenerative diseases.

Material and Methods

Materials

All reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO) unless noted otherwise.

Cell culture and treatments

PC12 cells were obtained from ATCC (Rockville, MD) and were maintained in a controlled environment at 37 °C and in 5 % CO₂ atmosphere. They were grown in RPMI-1640 medium, supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 10% horse serum and gentamicin (50 µg/mL). The culture medium was changed every 2 days. Cells were seeded at a cellular density of 30,000 cells/cm². Neuronal differentiation was induced for 4 days with 50 ng/mL nerve growth factor (NGF) in RPMI-1640 medium supplemented with 1% FBS. To examine the effect of 24-Epi on MPP⁺-induced cellular death and oxidative stress, neuronal PC12 cells were pretreated with 24-Epi (10⁻⁹ M) for 3 h and then exposed to MPP⁺ 5 mM for 24 h, 5 mM for 3 h for O₂^{•-} detection (Gelinis and Martinoli 2002; Gagne, Gelinis et al. 2003). For apoptosis experiments, we used 500 µM of MPP+ for 24 h, as already reported (Gelinis and Martinoli 2002; Gagne et al. 2003; Bournival et al. 2009). The final concentration of 10⁻⁹ M 24-Epi was chosen as the lowest dose able to rescue cells from MPP⁺-induced cellular death, after kinetic and dose-response studies (data not shown). All experiments were performed in phenol red-free medium and charcoal-stripped serum to remove steroids from the medium.

Cytotoxicity measurements

Cytotoxicity was evaluated by colorimetric assay based on the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity released from damaged cells into the supernatant (Korzeniewski and Callewaert 1983). LDH is a stable cytoplasmic enzyme present in all cells. It is rapidly released into the cell culture supernatant upon damage of the plasma membrane. The amount of enzyme activity detected in the culture supernatant correlates with the portion of lysed cells

(Decker and Lohmann-Matthes 1988; Martin and Clynes 1991). NGF-differentiated PC12 cells were grown and treated in collagen-coated 96-well plates. 50 µL of cell-free supernatant was transferred to the corresponding wells of a new 96-well plate. 100 µL of lactic acid dehydrogenase substrate mixture was added to each well as already described (Gelinis and Martinoli 2002). The plate was incubated, protected from light, for 20 minutes. Absorbance was measured at a wavelength of 490 nm on a microplate reader (Thermolab System, Franklin, MA). Total cellular LDH was determined by lysing the cells with 1% Triton X-100 (high control); the assay medium served as a low control and was subtracted from all absorbance measurements:

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{(\text{Experimental value} - \text{Low control})}{(\text{High control} - \text{Low control})} \times 100\%$$

ROS detection

The anti-oxidative effect of 24-Epi against MPP⁺-induced ROS (ONOO⁻, H₂O₂ and HOCl) was evaluated by DHR 123 assay according to the previously described method (Gelinis et al. 2004; Lahaie-Collins et al. 2008). Briefly, NGF-differentiated PC12 cells were grown and treated on collagen-coated slides in 24-well plates. Stock solution of DHR was prepared in dimethylsulfoxide under nitrogen, to a concentration of 10 mM and stored at -80°C. After 3 h pretreatment with 24-Epi and 24 h treatment with MPP+, neuronal PC12 cells were quickly washed with PBS 0.1 M and exposed to 250 µl of DHR at 37°C for 20 min. Slides with live cells were examined using with a Leitz Orthoplan fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany) and photographed with a Qimaging camera (Nikon, Mississauga, ON, Canada). We measured the fluorescence intensity using NIS Elements 2.2 software (Nikon, Mississauga, ON, Canada). Then, the anti-oxidative effect of 24-Epi against MPP⁺-induced O₂^{•-} was evaluated with MitoSOX™ Red (Invitrogen, Toronto) according to the manufacturer's protocol. In order to show the selectivity of the MitoSOX™ Red, 80 µM of N,N-diethyldithiocarbamate (DDC), an inhibitor of SOD, was used as a positive control. After 3 h pretreatment with 24-Epi and 3 h treatment MPP⁺, PC12 cells were washed with Hank's buffered salt solution (HBSS) and

incubated for 10 min with MitoSOX™ 5 μ M solution at 37°C. Cells were counterstained with Hoechst 33342, 10 min at 37°C, fixed for 15 min in 4 % paraformaldehyde at 37 °C and finally mounted with ProLong Antifade kit (Invitrogen, Toronto, ON, Canada). Slides were examined using with a Leitz Orthoplan fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany) and photographed with a Qimaging camera (Nikon, Mississauga, ON, Canada). Fluorescence intensity was measured using NIS Elements 2.2 software (Nikon, Mississauga, ON, Canada).

SOD, CAT and GPx activities

NGF-differentiated PC12 cells were grown and treated in collagen-coated 6-well plates. Neuronal cells were mechanically harvested and collected by centrifugation at 2,000g for 10 min at 4°C. For SOD and GPx activities, the pellets were homogenized in 1 mL of cold PBS and centrifuged at 2,000g for 10 min at 4°C. Then, the supernatants were discarded and the freeze-thaw method was used to break the cells (-20 °C for 20 min, then 37 °C bath for 10 min, repeated twice). The pellets were homogenized in cold PBS and centrifuged at 10,000g for 15 min at 4°C. Finally, the supernatant was analyzed according to the manufacturer's protocol (SOD Assay Kit-WST, Dojindo Molecular Technologies, Gaithersburg, MD; GPx Assay Kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). The reaction was monitored at 450 nm for SOD activity and 340 nm for GPx activity using a microplate reader (Thermolab System, Franklin, MA). For CAT activity, the pellets were homogenized in 1 ml of cold buffer (50 mM potassium phosphate, pH 7.0, containing 1 mM EDTA) and sonicated (3 times, 5 s). The samples were then centrifuged at 10,000g for 15 min at 4°C and the supernatant was assayed according to the manufacturer's protocol (Catalase Assay Kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). The reaction was monitored at 540 nm using a microplate reader (Thermolab System, Franklin, MA).

Apoptosis detection

Apoptotic neuronal cells were detected by both TUNEL (Roche Diagnostic Laval, Québec, Canada) and activated caspase-3 immunofluorescence. Neuronal PC12 cells were grown and treated on collagen coated circular glass coverslips in 24 wells (Fischer Scientific, Ottawa, ON, Canada). Cells were fixed for 15 min in 4 % paraformaldehyde at 37°C, washed and further incubated in a blocking and permeabilizing solution (FSG buffer containing 1 % BSA, 0.18 % fish skin gelatine, 0.1 % Triton-X and 0.02 % sodium azide) for 30 min at room temperature (RT). The cells were incubated with an anti-cleaved caspase-3 antibody (New England Biolabs, Pickering, Ont. Canada) diluted 1:500, for 2 h at RT, followed by a 90 min incubation with a Cy3-conjugated secondary antibody (Medicorp, Montreal, Quebec, Canada) diluted 1:500 for 1h at 4°C. Coverslips were then transferred to the TUNEL reaction mixture in a humidified atmosphere at 37°C. Cells were then rinsed with PBS, nuclei were counterstained with of Hoechst 33342 for 10 min at 37°C, and finally mounted with ProLong Antifade kit (Invitrogen, Toronto, Canada). Images were acquired with a Leitz Orthoplan fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany) and photographed with a Qimaging camera (Nikon, Mississauga, ON, Canada). Neuronal cells were considered to be apoptotic when they were positive for cleaved caspase-3 and their nuclei were stained with TUNEL. In order to show that the activation of caspase-3 is a key step in the MPP⁺-induced apoptotic pathway, NGF-differentiated PC12 cells were preincubated for 1 h with 50 µM Z-DEVD-FMK (Bachem, Torrance, CA), a cell-permeable caspase-3 inhibitor, followed by treatment with MPP⁺ for 24 h. We counted the number of apoptotic neuronal cells among 300 randomly chosen neuronal cells observed on 10 different optic fields, from 3 slides per group, as already reported (Bournival et al. 2009) by using NIS Elements 2.2 (Nikon, Mississauga, Ontario, Canada).

In addition, DNA fragmentation was assessed using the ssDNA Apoptosis ELISA kit (Chemicon International, Temecula, CA) according to the manufacturer's instruction, to quantify ssDNA present in apoptotic cells. This

procedure is based on the ability of a monoclonal antibody to detect ssDNA, which occurs in apoptotic cells, but not in necrotic cells or in cells with DNA breaks in the absence of apoptosis. This assay involves binding of cells to 96-well plates and treatment of the attached cells with formamide which selectively denature DNA in apoptotic cells. Then, a mixture of anti-ssDNA monoclonal antibody and peroxidase-conjugated secondary antibody was used to specifically identify the apoptotic cells. Finally, the reaction was stopped and ssDNA fragmentation was quantified by measuring the absorbance at 405 nm with a microplate reader (Thermolab System, Franklin, MA). The amount of ssDNA was calculated with reference to control conditions. To confirm the specificity of this assay, positive (single-stranded DNA fragment) and negative (S1 nuclease treated cells) control were also performed.

Electrophoresis and immunoblot analysis

NGF-differentiated PC12 cells were grown and treated in collagen-coated 6-well plates. Total cellular proteins were extracted with Nuclear Extraction Kit (Active Motif, Carlsbad, CA), diluted in 50 µl of lysis solution, and concentrations determined with a protein assay (BCA Protein Assay Kit; Pierce, Rockford, IL). Equal amounts of proteins were loaded onto 12% polyacrylamide gel-sodium dodecyl sulfate. After electrophoretic separation (180 volts, 1 h), polyacrylamide gels were transferred onto nylon PVDF membranes (0.22-µm pore size, BioRad, Hercules, CA) at 60 V for 2 h. The membranes were blocked with 5% non-fat powder milk for 1 h at RT. Immunoblotting was probed overnight at 4°C with the primary antibody. Dilution of rabbit anti-Bax antibody (Delta Biolabs, Gilroy, CA) was 1:1,000 while rabbit anti-Bcl2 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was 1:50. The following day, the membranes were washed, anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody diluted 1:10,000 was added for 2 h at RT. Immunopositive signals were visualized by enhanced chemiluminescence with the AlphaEase FC imaging system (Alpha Innotech, San Leandro, CA) and analyzed with AlphaEase FC software (Alpha Innotech, San Leandro, CA).

Statistical analysis

Significant differences between groups were determined by one-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc analysis with the GraphPad Instat program, version 3.06, for Windows© (San Diego, CA, www.graphpad.com). Data are expressed as the mean \pm S.E.M. from 3 independent experiments. Asterisks (*) indicate statistical differences between the treatment and respective control condition, and circles (o) show statistical differences between the treatment and MPP⁺ condition.

Results

24-Epi reduces cytotoxicity and production of ROS induced by MPP⁺.

The ability of 24-Epi to reverse MPP⁺-induced cytotoxicity was investigated using LDH colorimetric assay, as already described (Lahaie-Collins et al. 2008; Bournival et al. 2009). Cytotoxicity measurements revealed significant cell death in neuronal PC12 cells following exposure to MPP⁺ for 24 h (Fig. 1). Specifically, MPP⁺ induced 22% of cell death while 24-Epi, when used alone, did not cause significant cellular mortality. A 3h preincubation with 24-Epi before induction of oxidative stress significantly decreased MPP⁺-induced cytotoxicity. Precisely, 24-Epi protected neuronal PC12 cells against the toxic effects of MPP⁺ by decreasing the cellular death by 60% (Fig.1).

Figure 2 shows the scavenging effect of 24-Epi against MPP⁺-induced oxidative stress measured by DHR assay. Non-fluorescent dye DHR is oxidized to highly fluorescent rhodamine in the presence of several free radicals (OH^{\cdot} , NO_2^{\cdot} , CO_3^{2-} , H_2O_2 , HOCl, ONOO^{\cdot}) (Henderson and Chappell 1993; Kooy et al. 1994; Wrona et al. 2005; Wardman 2007). Figure 2A shows low levels of rhodamine fluorescence in control neuronal PC12 cells (Fig. 2A, Ctrl) as well as in cells treated with 24-Epi alone (Fig. 2A, 24-Epi). In contrast, a marked signal was detected in neuronal cells treated with MPP⁺ for 24 h (Fig. 2A, MPP⁺). A pretreatment with 24-Epi prior to MPP⁺ showed a damped signal in comparison to MPP⁺ alone (Fig. 2A, 24-Epi + MPP⁺), suggesting a scavenging role of 24-Epi on MPP⁺-induced production of ROS. Semi-quantitative image analysis (Fig. 2B) revealed high levels of fluorescent rhodamine only in MPP⁺ treated neuronal PC12 cells and a statistically significant reduction ($p<0.001$) when these cells were preincubated with 24-Epi prior to induction of oxidative stress (Fig. 2B).

In addition, the selective detection of $\text{O}_2^{\cdot\cdot}$ by the fluorogenic dye, MitoSOX Red, is shown in figure 3A, in neuronal PC12 cells after 3h of treatment. It should be noted that we performed a complete kinetic analysis at 0, 3, 15 and 24 h.

However, we detected visible levels of fluorescence, i.e., O_2^- , only at 3h of treatment. Marginal or slightly detectable levels of fluorescence were present at 15 or 24 h of treatments (data not shown). DDC was used as an inhibitor of SOD. Fluorescent pictures revealed high fluorescence intensity in MPP⁺ and DDC-treated cells after 3h treatments. Low levels of oxidized MitoSOX™ Red was detected in control neuronal PC12 cells (Fig. 3A, Ctrl) as well as in cells treated with 24-Epi alone (Fig. 3A, 24-Epi). Pre-treatment with 24-Epi almost completely abolished the fluorescence signal induced by MPP⁺ and DDC (Fig. 3A, 24-Epi + MPP⁺ and 24-Epi + DDC). Semi-quantitative image analysis showed high levels of fluorescent MitoSOX™ Red in neuronal PC12 cells treated with MPP⁺ and DDC and a considerable reduction ($p<0.001$) of the fluorescence intensity when these cells are treated with 24-Epi prior to MPP⁺ and DDC for 3 h (Fig. 3B).

Effects of 24-Epi on SOD, CAT and GPx activities.

SOD catalyses the dismutation of superoxide anion radicals by converting it to peroxide, which can be destroyed by CAT or GPx (Mates and Sanchez-Jimenez 1999; Klein and Ackerman 2003). We therefore investigated the effect of MPP⁺, 24-Epi and MPP⁺ + 24-Epi on SOD, CAT and GPx activities in neuronal PC12 cells. Figures 4A, B and C illustrate SOD, CAT and GPx activity respectively; and they reveal that the exposure of neuronal PC12 cells to MPP⁺ for 3h significantly increased the activity of these three antioxidant enzymes, corroborating a cell stress response to MPP⁺-induced production of ROS (Lahaie-Collins et al. 2008). At 15 h, MPP+ administration reduced SOD and GPx activities (Fig. 4A and C, MPP⁺), while CAT activity remained stable (Fig. 4B, MPP⁺), while, at 24 h, SOD and CAT activity were strongly reduced while GPx activity was increased. Then, our results show that the administration of 24-Epi alone also induced a very significant rise of SOD, CAT and GPx activities at 3 h, supporting an antioxidant role for this BR (Fig. 4A, B and C, 24-Epi). Specifically, 24-Epi induced a significant increased of SOD, CAT and GPx activity, with a maximal increase apparent after 3 h of treatment.

Afterward, at 15 and later on, SOD and CAT activities declines when exposed to 24-Epi (Fig. 4A and 4C, 24-Epi). On the other side, figure 4C shows that GPx activity declined at 15 h and then peaked after incubation with 24-Epi for 24 h. We also analyzed whether the administration of 24-Epi prior to MPP⁺ could modulates the activities of these antioxidant enzymes. We found that the administration of 24-Epi before induction of MPP⁺ oxidative damages significantly increased SOD, CAT and GPx at 3 h, at higher levels than those obtained with MPP⁺ alone but lower than those detected with 24-Epi alone. At 15 h, our results show that 24-Epi + MPP⁺ still elevate SOD activity upon control (Fig. 4A, 24-Epi + MPP⁺), while CAT activity levels are similar to those observed for 24-Epi alone (Fig. 4B, 24-Epi + MPP⁺) and GPx activity significantly decreases. Finally, at 24 h, SOD and CAT activity deeply decreased, while GPx activity increased to reach control levels (Fig. 4A, B, and C, 24-Epi + MPP⁺).

24-Epi reduces MPP⁺-induced apoptosis.

In order to determine whether 24-Epi protects neuronal PC12 cells from MPP⁺-induced apoptosis, we measured DNA fragmentation (Fig. 5), TUNEL assay and immunofluorescence with an antibody to activated caspase-3 (Fig. 6A and 6B). DNA fragmentation is a marker of late apoptosis and the exposure to 500 µM MPP⁺ for 24 h resulted in 60 % increase of DNA fragmentation in neuronal PC12 cells (Fig. 5). A pre-treatment with 24-Epi significantly ($p<0.01$) prevented the MPP⁺-induced increase of DNA fragmentation thus suggesting a powerful role for 24-Epi to reduce apoptotic death in our cell paradigm. Next, caspases are central initiators and executioners of the complex biochemical events associated with apoptotic cell death (Mignotte and Vayssiere 1998; Chowdhury et al. 2008). As the activation of caspase-3 has been shown to be one of the concluding effectors of the apoptosis process (Hartmann, Hunot, Michel, Muriel, Vyas, Faucheu, Mouatt-Prigent, Turmel, Srinivasan, Ruberg, Evan, Agid, and Hirsch 2000), we investigated whether 24-Epi has the ability to prevent MPP⁺-induced activation of caspase-3 (Fig. 6). Immunofluorescence (Fig. 6 panel B) clearly illustrated the presence of simultaneous TUNEL and

caspase-3 positive cells (shown in light blue) when MPP⁺ was administered alone. Furthermore, pretreatment of neuronal PC12 cells with a cell-permeable caspase-3 inhibitor (Z-DEVD-FMK) prior to MPP⁺, significantly decreased the MPP⁺-induced apoptosis. As already shown in Fig. 5, a 3 h-preincubation with 24-Epi prior to MPP⁺ revealed a considerable reduction ($p<0.001$) of the number of apoptotic neuronal PC12 cells (Fig. 6, panel B). These results strongly suggest an anti-apoptotic effect of 24-Epi and also indicate that MPP⁺-induced apoptosis is associated with caspase-3 activation.

24-Epi modulates Bax/Bcl2 protein expression.

We also investigated the modulation of 24-Epi on the protein expression of the pro-apoptotic gene, Bax, and on the anti-apoptotic gene Bcl-2. The ratio of pro-apoptotic Bax to anti-apoptotic Bcl-2 (Bax/Bcl-2) has been reported to be correlated to apoptosis (Wu et al. 2007; Bournival et al. 2009). Our results show that the administration of 24-Epi alone did not modulate the ratio Bax/Bcl-2 (Fig. 7). Then, the administration of MPP⁺ alone significantly increased Bax/Bcl-2 ratio, indicating that the MPP⁺-induced apoptosis in PC12 may be mediated by the mitochondrial pathway. The MPP⁺-induced increase of Bax/Bcl-2 ratio was considerably attenuated in cells pretreated with 24-Epi (Fig. 7) to reach levels similar to control, thus indicating for the first time that the brassinosteroid 24-Epi is a strong modulator of pro-apoptotic and anti-apoptotic genes expression.

Discussion

In this paper we demonstrated for the first time that 24-Epi, a BR found in a variety of vegetables, including *Vicia faba*, can exert anti-oxidative and anti-apoptotic actions in mammalian neural cells. In particular, we have used PC12 cells, a known, reliable and efficient model for the investigation of oxidative stress and neuroprotection of DA neurons (Gelinás and Martinoli 2002; Chiasson et al. 2006). After NGF administration, PC12 cells differentiate into a neuronal-like phenotype that secretes high DA levels and expresses TH, DAT, neurofilaments as well as ER α and ER β (Kadota et al. 1996; Nilsen et al. 1998; Gelinás and Martinoli 2002; Chiasson et al. 2006).

Recent literature has enlightened the powerful properties of various natural polyphenols against oxidative stress in several cellular and *in vivo* paradigms of neurodegenerative diseases (Singh et al. 2008; Alcain and Villalba 2009; Pandey and Rizvi 2009; Baur 2010; Iriti et al. 2010). Currently, several natural polyphenols are under intense study for their anti-oxidative effects and their possible use as complementary and/or preventive therapies for diseases (Baur 2010; Iriti et al. 2010). Our aim was to demonstrate that BRs, phytosterols contained in a wide variety of vegetables, do indeed possess anti-oxidative as well as neuroprotective properties in neuronal PC12 cells, a cellular model of Parkinson's disease (Greene and Tischler 1976; Ryu et al. 2005).

Presently, phytosterols are recognized to act as antioxidants (Yasukazu and Etsuo 2003) and some of them include anti-oxidative properties associated with neuroprotective effects (Chen et al. 2005; Zhao et al. 2005). Others, such as β -sitosterol, modulate SOD, GPx and CAT activities (Vivancos and Moreno 2005) and ginsenoside Rg1, a phytosterol derived from ginseng, is also reported to be anti-apoptotic in neuronal PC12 cells following oxidative stress (Chen et al. 2001; Chen et al. 2003). However, BRs in particular, are much less studied in mammalian system, even if recent literature is pointing out interesting properties of BRs on mammals systems, such as anti-viral (Michelini et al. 2004)

anticancer and antiproliferative activities (Wu and Lou 2007; Malikova et al. 2008; Slavikova et al. 2008). At present, no data are available about a possible neuroprotective and/or antioxidative role of BRs in mammalian neurons, *in vitro* or *in vivo*. As such, in this study, we examined the neuroprotective, antioxidant and anti-apoptotic consequences of low doses of 24-Epi (10^{-9} M), a common BRs, against oxidative damages induced by treatments with MPP⁺, the active metabolite of MPTP, a known parkinsonian toxin. The positive outcomes we reported in DAergic neuronal culture, using nanomolar doses of 24-Epi, on parameters of neuroprotection, oxidative metabolism and apoptosis, are supported by the fact that BRs may be considered the plant equivalent of steroid hormone in vertebrate, sharing similar metabolic pathways (Rosati et al. 2003). Thus, BRs could easily pass through the blood–brain-barrier and are likely to accumulate in brain and serum, as demonstrated for plan sterol and stanol esters in Watanabe rabbits (Fricke et al. 2007). In particular, we demonstrated that 24-Epi can protect DA neuronal cells from MPP⁺-induced cellular death by reducing intracellular ROS production. Indeed, non-fluorescent DHR has the capacity to enter cells and, once in, it is oxidized by oxygen species (superoxide anion, peroxynitrite) in fluorescent rhodamine (Kooy et al. 1994). Accordingly, our results show increased rhodamine fluorescence after MPP⁺ treatment and reduced fluorescence when 24-Epi is administered to neuronal PC12 cells prior to MPP⁺. DHR has been used extensively to measure intracellular ROS, but it does not measure O₂[•] production. MitoSOX™ Red is a selective indicator of mitochondrial O₂[•] production and becomes highly fluorescent when oxidized by this ROS but not by the other oxidants. By MitoSOX™ Red, we illustrated an increase of fluorescence when MPP⁺ is administered alone and a substantial reduction when 24-Epi is given with MPP⁺, after 3h of treatment, thus suggesting a potent scavenging role for 24-Epi. As O₂[•] is a highly reactive ROS, we could not detect its presence by MitoSOX™ Red at 15 or 24 h of treatment. However, at cellular level, since antioxidant enzymes are the primary defense mechanisms of protection against ROS damage, SOD, CAT and GPx play pivotal roles in preventing cellular damage. In our studies, augmented SOD activity

demonstrates that 24-Epi may enhance the ability to eliminate ROS during various oxidative stresses and may indicate a protective role in pre-treatment experiments. Besides, several other natural and synthetic molecules are reported to heighten SOD activity in various cellular systems (Hou et al. 2004; An et al. 2006; Jung et al. 2006; Lahaie-Collins et al. 2008). MPP⁺ evenly augmented SOD activity in our experiments, as described in the recent literature in vitro (Lahaie-Collins et al. 2008) and in vivo, where MPTP increased SOD activity by generating superoxide ions (Thomas et al. 2008). This apparent contrasting result should be analyzed by comparing it with the ones obtained by fluorescent rhodamine at 24 h and MitoSOX™ Red, at 3 h. Indeed, low ROS levels, illustrated by low rhodamine and low MitoSOX™ Red fluorescence (24-Epi alone and 24-Epi+MPP⁺, Fig. 2 and Fig. 3), sustain the ability of 24-Epi to induce SOD activity throughout 24 h, as demonstrated by our data. When MPP⁺ was administered, rhodamine and MitoSOX™ Red fluorescence indicated high ROS levels and, consequently, the cells responded by augmenting SOD activity, as already reported (Lahaie-Collins et al. 2008; Thomas et al. 2008). Our findings clearly show that SOD activity may be induced by 2 different mechanisms, a protective mechanism (24-Epi) and a response-to-stress mechanism (MPP⁺). More importantly, pretreatment with 24-Epi prior to MPP⁺ administration indicates low ROS levels, as revealed by rhodamine and MitoSOX™ Red fluorescence, thus suggesting that the relative low SOD activity induced by 24-Epi pretreatment may have already scavenged MPP⁺-generated ROS before 24h.

CAT activity is another parameter of oxidative stress. Our results point out that 24-Epi alone decrease CAT activity and 24-Epi pretreatment reduces the MPP⁺-induced increase in CAT activity, confirming a scavenging role for 24-Epi in the pretreatment experimental condition, as already reported for another antioxidant natural molecule, sesamin (Lahaie-Collins, 2008). GPx are selenium-dependent enzymes involved in antioxidant defense and intracellular redox regulation and modulation. Cardiovascular and neuroprotective effects of

the trace element, selenium, have been reported, although long term supplementation with selenium has been accounted for a “ying-yang” effect (Steinbrenner and Sies 2009). The glutathione response following MPP⁺ treatments has been already reported in a DAergic cell line and is in accordance with our results demonstrating an increase in GPx activity at 24 h after toxin administration (Drechsel et al. 2007). Our data and others suggest a change in glutathione regulatory enzyme activities during the kinetic of MPP⁺ administration (Drechsel et al. 2007). More interesting are our data showing a significant increase in GPx activity following 24-Epi administration, thus suggesting that this molecule may increase the stock of anti-oxidant enzyme above control levels.

In addition, our results show a clear neuroprotective role of 24-Epi against cellular death induced by MPP⁺ administration. Then, we also show that 24-Epi is a potent modulator of apoptosis, opposing MPP⁺ induced DNA fragmentation and decreasing MPP⁺-induced apoptotic/antiapoptotic protein expression, Bax/Bcl-2, ratio. Altogether, our results demonstrate that the MPP⁺-induced apoptosis in DAergic cells can be reverted by preadministration of 24-Ep. Thus 24-Epi may be accounted for another natural molecule interacting with intracellular apoptotic pathways (Bureau et al. 2008; Bournival et al. 2009). Recent literature reports anticancer and antiproliferative activity of two BRs, 28-homocastasterone and 24-Epi (Malikova et al. 2008) supporting a cytotoxic and apoptotic role for these BRs. This is not the first time that neuroprotective and antioxidant natural molecule appears to act as “double agent” on apoptotic parameters depending on cell lines. First, it should be noted that to demonstrate anticancer and antiproliferative activity of BRs, the authors used μM concentration of BRs and most of the toxicity was apparent at 10 μM and higher (Malikova et al. 2008). In our study, we used nanomolar concentration of 24-Epi since micromolar concentrations would likely be impossible to sustain *in vivo* in humans due, in part, to the low absorption of phytosterols (Gylling et al. 2010). On the other hand, neuronal PC12 cells are differentiated cells, expressing a neuronal phenotype as well as DAT, neurofilament proteins and estrogens

receptors α and β , in contrast to native mitotic PC12 cells, where several polyphenols do not counteract the MPP⁺-induced cellular death (our unpublished data).

Finally, this is the first study to enlighten the powerful role of 24-Epi on parameters of neuronal cell distress, apoptosis and cellular death. Other studies are needed to further document its possible use as natural molecule in preventive or/and complementary strategies for neurodegenerative diseases.

References

- Adams J D, Jr., Klaaidman L K and Leung A C (1993) MPP+ and MPDP+ induced oxygen radical formation with mitochondrial enzymes. *Free Radic Biol Med* 15(15):181-186
- Alcain F J and Villalba J M (2009) Sirtuin activators. *Expert Opin Ther Pat* 19(19):403-414
- Ali B, Hayat S, Fariduddin Q and Ahmad A (2008) 24-Epibrassinolide protects against the stress generated by salinity and nickel in Brassica juncea. *Chemosphere* 72(72):1387-1392
- An L J, Guan S, Shi G F, Bao Y M, Duan Y L and Jiang B (2006) Protocatechuic acid from Alpinia oxyphylla against MPP+-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Food Chem Toxicol* 44(44):436-443
- Anekonda T S (2006) Resveratrol--a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev* 52(52):316-326
- Apaydin H, Ertan S and Ozekmekci S (2000) Broad bean (*Vicia faba*)--a natural source of L-dopa--prolongs "on" periods in patients with Parkinson's disease who have "on-off" fluctuations. *Mov Disord* 15(15):164-166
- Ara J, Przedborski S, Naini A B, Jackson-Lewis V, Trifiletti R R, Horwitz J and Ischiropoulos H (1998) Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(95):7659-7663
- Baur J A and Sinclair D A (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5(5):493-506
- Baur J A (2010) Resveratrol, sirtuins, and the promise of a DR mimetic. *Mech Ageing Dev* 131(131):261-269
- Blanchet J, Longpre F, Bureau G, Morissette M, DiPaolo T, Bronchti G and Martinoli M G (2008) Resveratrol, a red wine polyphenol, protects dopaminergic neurons in MPTP-treated mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32(32):1243-1250
- Bournival J, Quessy P and Martinoli M G (2009) Protective Effects of Resveratrol and Quercetin Against MPP(+) -Induced Oxidative Stress Act by Modulating Markers of Apoptotic Death in Dopaminergic Neurons. *Cell Mol Neurobiol* 29: 1169-1180.

- Bureau G, Longpre F and Martinoli M G (2008) Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. *J Neurosci Res* 86(86):403-410
- Calabrese V, Butterfield D A and Stella A M (2003) Nutritional antioxidants and the heme oxygenase pathway of stress tolerance: novel targets for neuroprotection in Alzheimer's disease. *Ital J Biochem* 52(52):177-181
- Calon F, Lavertu N, Lemieux A M, Morissette M, Goulet M, Grondin R, Blanchet P J, Bedard P J and Di Paolo T (2001) Effect of MPTP-induced denervation on basal ganglia GABA(B) receptors: correlation with dopamine concentrations and dopamine transporter. *Synapse* 40(40):225-234
- Cassarino D S, Fall C P, Swerdlow R H, Smith T S, Halvorsen E M, Miller S W, Parks J P, Parker W D, Jr. and Bennett J P, Jr. (1997) Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1362(1362):77-86
- Chen X C, Zhu Y G, Wang X Z, Zhu L A and Huang C (2001) Protective effect of ginsenoside Rg1 on dopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Acta Pharmacol Sin* 22(22):673-678
- Chen X C, Zhu Y G, Zhu L A, Huang C, Chen Y, Chen L M, Fang F, Zhou Y C and Zhao C H (2003) Ginsenoside Rg1 attenuates dopamine-induced apoptosis in PC12 cells by suppressing oxidative stress. *Eur J Pharmacol* 473(473):1-7
- Chen X C, Zhou Y C, Chen Y, Zhu Y G, Fang F and Chen L M (2005) Ginsenoside Rg1 reduces MPTP-induced substantia nigra neuron loss by suppressing oxidative stress. *Acta Pharmacol Sin* 26(26):56-62
- Chiasson K, Lahaie-Collins V, Bournival J, Delapierre B, Gelinas S and Martinoli M G (2006) Oxidative stress and 17-alpha- and 17-beta-estradiol modulate neurofilaments differently. *J Mol Neurosci* 30(30):297-310
- Chowdhury I, Tharakan B and Bhat G K (2008) Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 151(151):10-27
- Dauer W and Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39(39):889-909
- Decker T and Lohmann-Matthes M L (1988) A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 115(115):61-69

Drechsel D A, Liang L P and Patel M (2007) 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced alterations of glutathione status in immortalized rat dopaminergic neurons. *Toxicol Appl Pharmacol* 220(220):341-348

Farina E, Piu P and Strinna L (1974) [Extraction of L-DOPA from Vicia faba L. and other plants of the leguminous genera]. *Boll Soc Ital Biol Sper* 50(50):508-511

Fricke C B, Schroder M, Poulsen M, von Bergmann K, Wester I, Knudsen I, Mortensen A and Lutjohann D (2007) Increased plant sterol and stanol levels in brain of Watanabe rabbits fed rapeseed oil derived plant sterol or stanol esters. *Br J Nutr* 98(98):890-899

Gagne B, Gelinas S, Bureau G, Lagace B, Ramassamy C, Chiasson K, Valastro B and Martinoli M G (2003) Effects of estradiol, phytoestrogens, and Ginkgo biloba extracts against 1-methyl-4-phenyl-pyridine-induced oxidative stress. *Endocrine* 21(21):89-95

Gamoh K, Omote K, Okamoto N and Takatsuto S (1989) High-performance liquid chromatography of brassinosteroids in plants with derivatization using 9-phenanthreneboronic acid. *J. Chromatogr* 469(469):424-428

Gelinas S and Martinoli M G (2002) Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP⁺-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells. *J Neurosci Res* 70(70):90-96

Gelinas S, Bureau G, Valastro B, Massicotte G, Cicchetti F, Chiasson K, Gagne B, Blanchet J and Martinoli M G (2004) Alpha and beta estradiol protect neuronal but not native PC12 cells from paraquat-induced oxidative stress. *Neurotox Res* 6(6):141-148

Greene L A and Tischler A S (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(73):2424-2428

Gylling H, Hallikainen M, Nissinen M J, Simonen P and Miettinen T A (2010) Very high plant stanol intake and serum plant stanols and non-cholesterol sterols. *Eur J Nutr* 49(49):111-117

Hamdy A H, Aboutabl E A, Sameer S, Hussein A A, Diaz-Marrero A R, Darias J and Cueto M (2009) 3-Keto-22-epi-28-nor-cathasterone, a brassinosteroid-related metabolite from *Cystoseira myrica*. *Steroids* (74)12:927-930.

Hartley A, Stone J M, Heron C, Cooper J M and Schapira A H (1994) Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 63(63):1987-1990

Henderson L M and Chappell J B (1993) Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur J Biochem* 217(217):973-980

Hou R C, Wu C C, Yang C H and Jeng K C (2004) Protective effects of sesamin and sesamolin on murine BV-2 microglia cell line under hypoxia. *Neurosci Lett* 367(367):10-13

Ikekawa N, Nishiyama F and Fujimoto Y (1988) Identification of 24-epibrassinolide in bee pollen of the broad bean, *Vicia faba* L. *Chem. Pharm. Bull.* 36(36):405-407

Iriti M, Vitalini S, Fico G and Faoro F (2010) Neuroprotective herbs and foods from different traditional medicines and diets. *Molecules* (15)5:3517-3555

Jakowec M W, Nixon K, Hogg E, McNeill T and Petzinger G M (2004) Tyrosine hydroxylase and dopamine transporter expression following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration of the mouse nigrostriatal pathway. *J Neurosci Res* 76(76):539-550

Jung T W, Lee J Y, Shim W S, Kang E S, Kim S K, Ahn C W, Lee H C and Cha B S (2006) Rosiglitazone protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against acetaldehyde-induced cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 340(340):221-227

Kadota T, Yamaai T, Saito Y, Akita Y, Kawashima S, Moroi K, Inagaki N and Kadota K (1996) Expression of dopamine transporter at the tips of growing neurites of PC12 cells. *J Histochem Cytochem* 44(44):989-996

Keeney P M, Xie J, Capaldi R A and Bennett J P, Jr. (2006) Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci* 26(26):5256-5264

Khripach V, Zhabinskii V and De Groot A (2000) Twenty years of brassinosteroids: steroid plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Annals of Botany* 86(86):441-447

Khripach V A, Zhabinskii V N and de Groot A E (1999) Brassinosteroids: a new class of plant hormones. *Plant Growth Regulation* 28(1):73-74

Klein J A and Ackerman S L (2003) Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest* 111(111):785-793

Kooy N W, Royall J A, Ischiropoulos H and Beckman J S (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* 16(16):149-156

- Korzeniewski C and Callewaert D M (1983) An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods* 64(64):313-320
- Lahaie-Collins V, Bournival J, Plouffe M, Carange J and Martinoli M G (2008) Sesamin modulates tyrosine hydroxylase, superoxide dismutase, catalase, inducible NO synthase and interleukin-6 expression in dopaminergic cells under MPP⁺-induced oxidative stress. *Oxidative Medicine & Cellular Longevity* 1(1):1-9
- LeWitt P A (2009) Levodopa therapeutics for Parkinson's disease: new developments. *Parkinsonism Relat Disord* 15 Suppl 1(15 Suppl 1):S31-34
- Malikova J, Swaczynova J, Kolar Z and Strnad M (2008) Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry* 69(69):418-426
- Martin A and Clynes M (1991) Acid phosphatase: endpoint for in vitro toxicity tests. *In Vitro Cell Dev Biol* 27A(27A):183-184
- Mates J M and Sanchez-Jimenez F (1999) Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 4(4):D339-345
- Mazorra L M, Núñez M, Hechavarria M, Coll F and Sánchez-Blanco M J (2002) Influence of brassinosteroids on antioxidant enzymes activity in tomato under different temperatures. *Biologica Plantarum* 45(45):593-596
- Michelini F M, Ramirez J A, Berra A, Galagovsky L R and Alche L E (2004) In vitro and in vivo antiherpetic activity of three new synthetic brassinosteroid analogues. *Steroids* 69(69):713-720
- Mignotte B and Vayssiere J L (1998) Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem* 252(252):1-15
- Mizuno Y, Sone N and Saitoh T (1987) Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion on activities of the enzymes in the electron transport system in mouse brain. *J Neurochem* 48(48):1787-1793
- Navarro A, Boveris A, Bandez M J, Sanchez-Pino M J, Gomez C, Muntane G and Ferrer I (2009) Human brain cortex: mitochondrial oxidative damage and adaptive response in Parkinson disease and in dementia with Lewy bodies. *Free Radic Biol Med* 46(46):1574-1580
- Nilsen J, Mor G and Naftolin F (1998) Raloxifene induces neurite outgrowth in estrogen receptor positive PC12 cells. *Menopause* 5(5):211-216

Olanow C W (2007) The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease--2007. *Mov Disord* 22 Suppl 17(22 Suppl 17):S335-342

Özdemir F, Bor M, Demiral T and Türkan I (2004) Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa L.*) under salinity stress. *Plant Growth Regulation* 42(42):203-211

Pandey K B and Rizvi S I (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2(2):270-278

Park K-H, Yokota T, Sakurai A and Takahashi N (1987) Occurrence of castasterone, brassinolide and methyl 4-chloroindole-3-acetate in immature *Vicia faba* seeds. *Agric Biol Chem* 51(51):3081-3086

Przedborski S, Tieu K, Perier C and Vila M (2004) MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr* 36(36):375-379

Rabey J M, Vered Y, Shabtai H, Graff E, Harsat A and Korczyn A D (1993) Broad bean (*Vicia faba*) consumption and Parkinson's disease. *Adv Neurol* 60(60):681-684

Raguthu L, Varanese S, Flancbaum L, Tayler E and Di Rocco A (2009) Fava beans and Parkinson's disease: useful 'natural supplement' or useless risk? *Eur J Neurol* 16(16):e171

Ramirez J A, Teme Centurion O M, Gros E G and Galagovsky L R (2000) Synthesis and bioactivity evaluation of brassinosteroid analogs. *Steroids* 65(65):329-337

Rosati F, Danza G, Guarna A, Cini N, Racchi M L and Serio M (2003) New evidence of similarity between human and plant steroid metabolism: 5alpha-reductase activity in *Solanum malacoxylon*. *Endocrinology* 144(144):220-229

Ryu E J, Angelastro J M and Greene L A (2005) Analysis of gene expression changes in a cellular model of Parkinson disease. *Neurobiol Dis* 18(18):54-74

Schober A (2004) Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* 318(318):215-224

Shang T, Kotamraju S, Kalivendi S V, Hillard C J and Kalyanaraman B (2004) 1-Methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in cerebellar granule neurons is mediated by transferrin receptor iron-dependent depletion of tetrahydrobiopterin and neuronal nitric-oxide synthase-derived superoxide. *J Biol Chem* 279(279):19099-19112

- Singh M, Arseneault M, Sanderson T, Murthy V and Ramassamy C (2008) Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *J Agric Food Chem* 56(56):4855-4873
- Slavikova B, Kohout L, Budesinsky M, Swaczynova J and Kasal A (2008) Brassinosteroids: synthesis and activity of some fluoro analogues. *J Med Chem* 51(51):3979-3984
- Steinbrenner H and Sies H (2009) Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1790(1790):1478-1485
- Thomas B, Saravanan K S and Mohanakumar K P (2008) In vitro and in vivo evidences that antioxidant action contributes to the neuroprotective effects of the neuronal nitric oxide synthase and monoamine oxidase-B inhibitor, 7-nitroindazole. *Neurochem Int* 52(52):990-1001
- Vivancos M and Moreno J J (2005) beta-Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. *Free Radic Biol Med* 39(39):91-97
- Wachsman M B, Ramirez J A, Talarico L B, Galagovsky L R and Coto C E (2004) Antiviral activity of natural and synthetic brassinosteroids. *Current Medicine and chemistry* 3(3):163-179
- Wardman P (2007) Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med* 43(43):995-1022
- Wrona M, Patel K and Wardman P (2005) Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med* 38(38):262-270
- Wu Y, Shang Y, Sun S G, Liu R G and Yang W Q (2007) Protective effect of erythropoietin against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurodegeneration in PC12 cells. *Neurosci Bull* 23(23):156-164
- Wu Y D and Lou Y J (2007) Brassinolide, a plant sterol from pollen of *Brassica napus* L., induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. *Pharmazie* 62(62):392-395
- Yasukazu Y and Etsuo N (2003) Antioxidant effects of phytosterol and its components. *Journal Nutritional science and vitaminology* 49(49):277-280

Zhao H B, Wang S Z, He Q H, Yuan L, Chen A F and Lin Z B (2005) Ganoderma total sterol (GS) and GS1 protect rat cerebral cortical neurons from hypoxia/reoxygenation injury. *Life Sci* 76(76):1027-1037

Zhou C, Huang Y and Przedborski S (2008) Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann N Y Acad Sci* 1147(1147):93-104

Figure Legends

Figure 1. Effect of 24-Epi against MPP⁺-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells, as measured by colorimetric assay based on LDH activity. Neuronal cells were pretreated with 24-Epi for 3 h and then exposed to MPP⁺ for 24 h. The absorbance value obtained for the untreated control was subtracted from all other values and data are expressed as percent of values in untreated control cells and are mean \pm S.E.M, as described in Materials and Methods. n=3. *** p<0.001 vs Ctrl and $^{\circ\circ}$ p<0.01 vs MPP⁺.

Figure 2. Rhodamine detection of ROS within neuronal PC12 cells. Nonfluorescent DHR is converted in fluorescent rhodamine in presence of free radicals. **A:** Fluorescence microphotographs; Ctrl: cells were treated with vehicle alone for 24 h, 24-Epi: cells were treated with 10^{-9} M 24-Epi for 24 h, MPP⁺: cells were treated with 5 mM MPP⁺ for 24 h, 24-Epi + MPP⁺: cells were treated with 10^{-9} M 24-Epi, then 5 mM MPP⁺ was added for 24 h. A marked signal of fluorescent rhodamine is evident only in cells treated with MPP⁺ but not with the vehicle (Ctrl) or 24-Epi alone. **B:** Semi-quantitative image analysis. Data are expressed in relative fluorescent units and are mean \pm S.E.M. Magnification 400x. n=3. * p<0.05 *** and p<0.001 vs Ctrl and $^{\circ\circ\circ}$ p<0.001 vs MPP⁺.

Figure 3. Selective detection of O₂^{•-} by MitoSOX™ Red in neuronal PC12 cells. Once in the cell, this fluorogenic dye is oxidized by superoxide and exhibits red fluorescence. **A:** Fluorescence microphotographs; Ctrl: cells were treated with vehicle alone for 3 h, 24-Epi: cells were treated with 10^{-9} M 24-Epi for 3 h, MPP⁺: cells were treated with 5 mM MPP⁺ for 3 h, 24-Epi + MPP⁺: cells were treated with 10^{-9} M 24-Epi, then 5 mM MPP⁺ was added for 3 h, DDC: cells were treated with 80 μ M DDC for 3 h, 24-Epi + DDC: cells were treated with 10^{-9} M 24-Epi, then 80 μ M DDC for 3 h. The fluorescence intensity is greatly increased in cells treated with MPP⁺ and DDC but not with the vehicle (Ctrl) or 24-Epi alone. **B:** Semi-quantitative image analysis. Data are expressed in relative

fluorescent units and are mean \pm S.E.M. Magnification 400x. n=3. *** p<0.001 vs Ctrl, $^{\circ\circ\circ}$ p<0.001 vs MPP⁺ and *** p<0.001 vs DDC.

Figure 4. Time course changes in antioxidant enzymes activities in neuronal PC12 cells. **A.** SOD activity was significantly increased in the presence of MPP⁺ (\blacktriangle) whereas 24-Epi (\blacksquare) induced a higher increase of the activity of this antioxidant enzyme compared with MPP⁺. Preincubation with 24-Epi prior to MPP⁺ (\bullet) also rose SOD activity. Maximal increase was apparent after 3 h of treatment. **B.** MPP⁺ (\blacktriangle) induced a constant increased of CAT activity. 24-Epi (\blacksquare) greatly rose CAT activity after 3 h of incubation and then this increase declined and CAT became less active than the baseline after 24 h exposure to 24-Epi. Pretreatment with 24-Epi before MPP⁺ (\bullet) increased CAT activities equivalent to those observed in cells treated with 24-Epi alone. **C.** After a 3 h of incubation, GPx activity was significantly increased in the presence of MPP⁺ (\blacktriangle) whereas 24-Epi (\blacksquare) induced a higher increase of the activity of this antioxidant enzyme compared with MPP⁺. Preincubation with 24-Epi prior to MPP⁺ (\bullet) also upregulated GPx activity. Maximal increase was apparent after 24 h of treatment. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. n=3. * p<0.05, ** p<0.01 and *** p<0.001 vs Ctrl; $^{\circ}$ p<0.05, $^{\circ\circ}$ p<0.01 and $^{\circ\circ\circ}$ p<0.001 vs MPP⁺.

Figure 5. Detection of DNA fragmentation in apoptotic cells with monoclonal antibody to ssDNA. PC12 cells exposed to 500 μ M MPP⁺ for 24 h revealed a significant increase in DNA fragmentation compared with control. 24-Epi alone did not induce DNA fragmentation while pre-treatment of MPP⁺-treated cells with 24-Epi significantly decreased DNA fragmentation. Data are expressed as absorbance values and are mean \pm S.E.M. n=3. ** p<0.01 vs Ctrl and $^{\circ\circ}$ p<0.01 vs MPP⁺.

Figure 6. A: Histogram showing the percentage of apoptotic cells counted on triple-stained slides (merged) as described in Materials and Methods. In order to show that the activation of caspase-3 is a key step in the MPP⁺-induced

apoptotic pathway, PC12 neuronal cells were pretreated with Z-DEVD-FMK, a cell-permeable caspase-3 inhibitor, followed by treatment with MPP⁺. Pre-treatment with 24-Epi strongly reduced the number of apoptotic neuronal PC12 cells while pre-treatment with caspase-3 inhibitor prevented MPP⁺-induced apoptosis. Data are expressed as percentage of apoptotic cells and are mean \pm S.E.M. n=3. * p<0.05 and *** p<0.001 vs Ctrl and *** p<0.001 vs MPP⁺. **B:** Immunofluorescence detection of apoptotic neuronal PC12 cells. Blue: neuronal PC12 nuclei were counterstained with DAPI. Red: anti-cleaved caspase-3 antibody. Green: TUNEL. Merged: cells are considered apoptotic when positive for both TUNEL (green) and anti-cleaved caspase-3 antibody (red). They appear as light blue cells because of the third superposition of dark blue DAPI. Immunofluorescence clearly reveals that there is fewer apoptotic PC12 cells when cells are treated with 24-Epi prior to MPP⁺ addition.

Figure 7. Effect of 24-Epi on the Bax/Bcl-2 ratio in neuronal PC12 cells. Cells were treated with MPP⁺ 500 μ M and/or 24-Epi for 24 h. The levels of Bax and Bcl-2 protein expression were quantified and the Bax/Bcl-2 ratio was determined for each treatment. 24-Epi alone did not modulate Bax/Bcl-2 ratio. In contrast, the Bax/Bcl-2 ratio increased upon treatment with MPP⁺ while the addition of 24-Epi significantly prevented this increase. Data are expressed as percent of values in untreated control cells and are mean \pm S.E.M. n=3. ** p<0.01 vs Ctrl and *** p<0.001 vs MPP⁺.

Figures

Figure 1

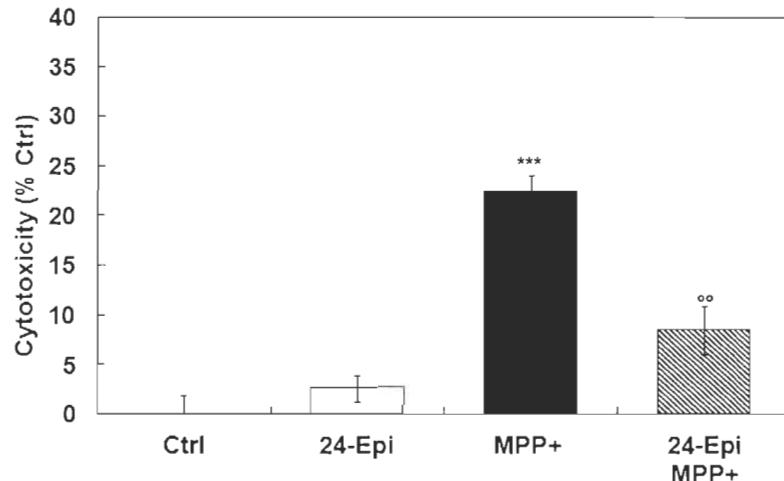


Figure 2A

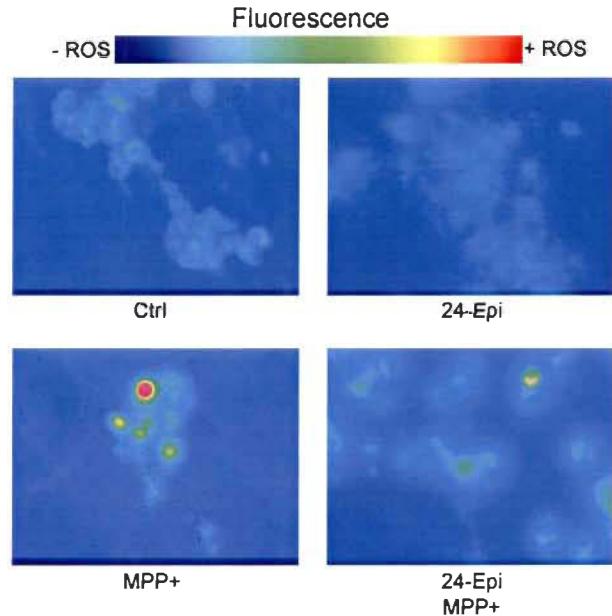


Figure 2B

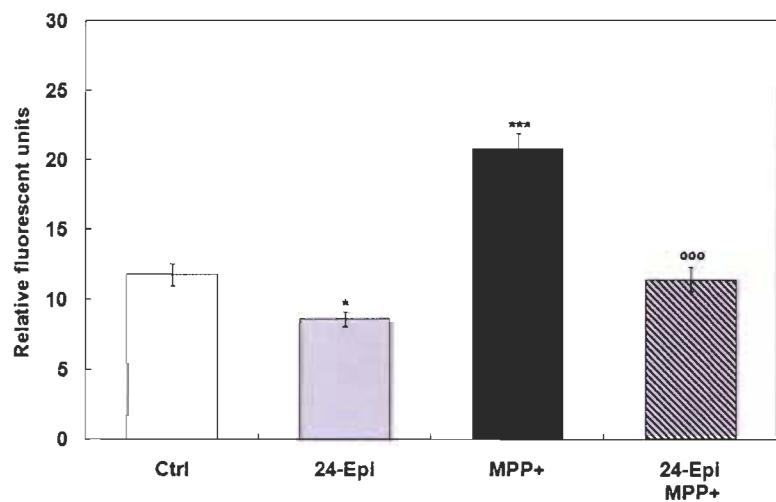


Figure 3A

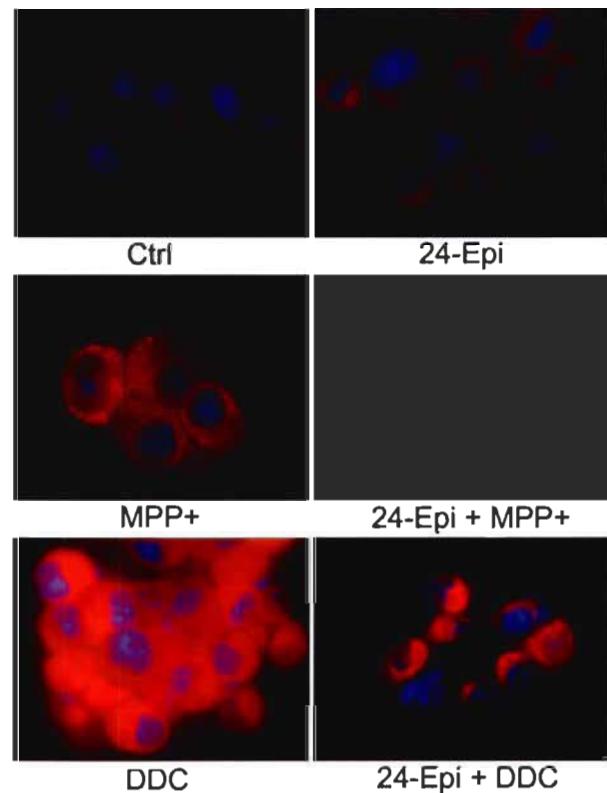


Figure 3B

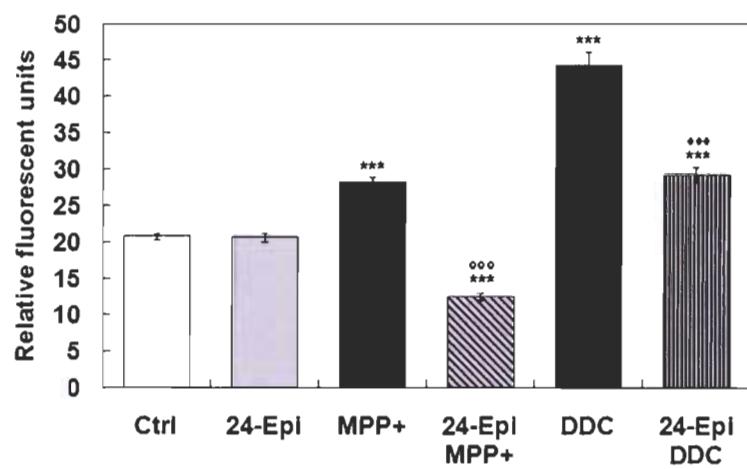


Figure 4A

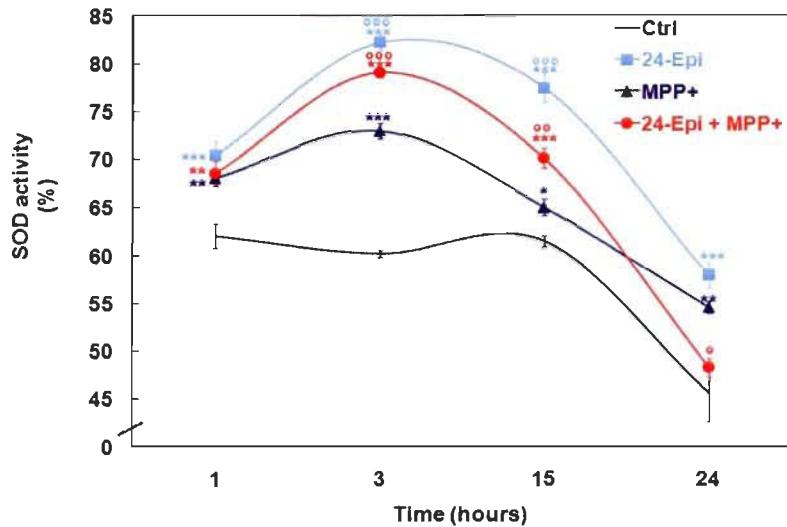


Figure 4B

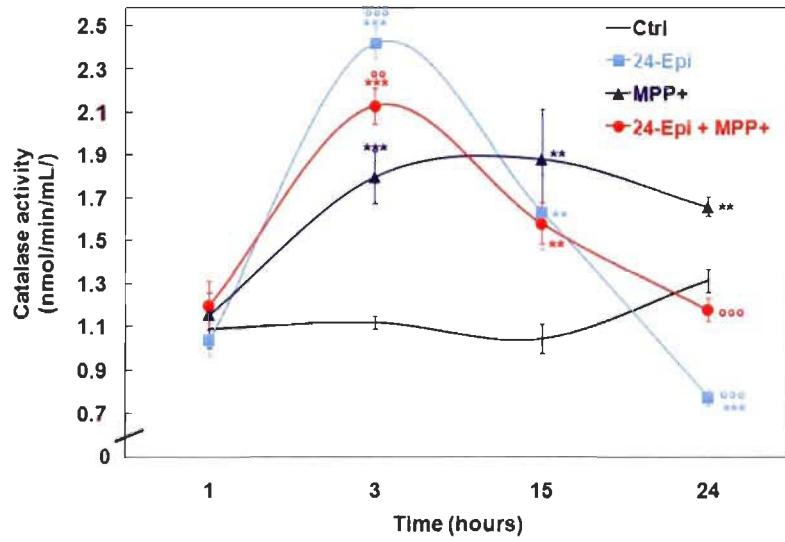


Figure 4C

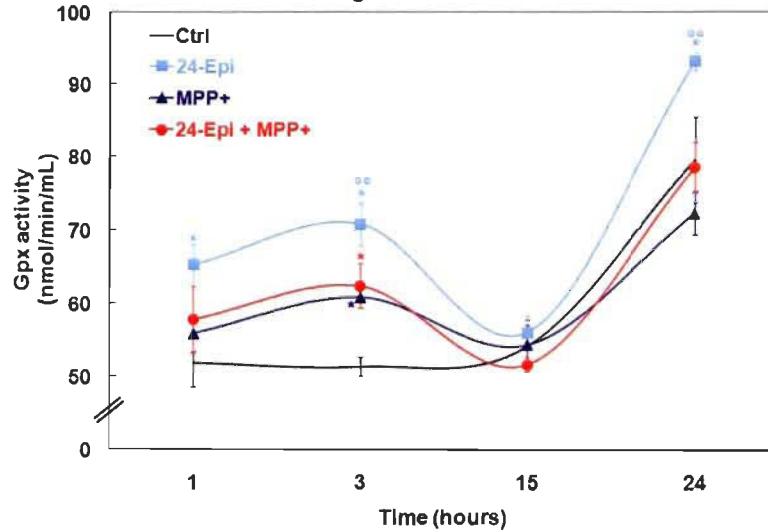


Figure 5

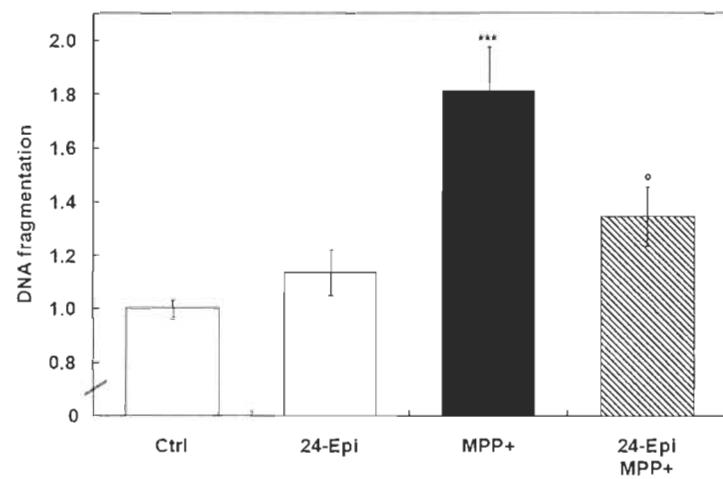


Figure 6

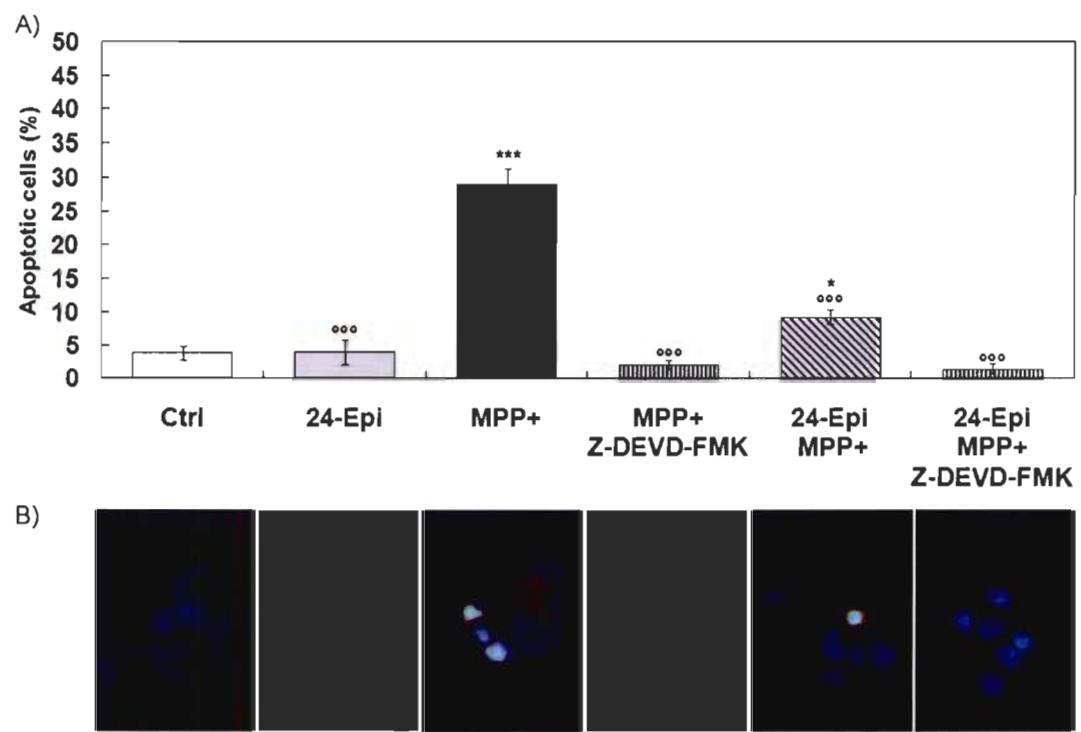
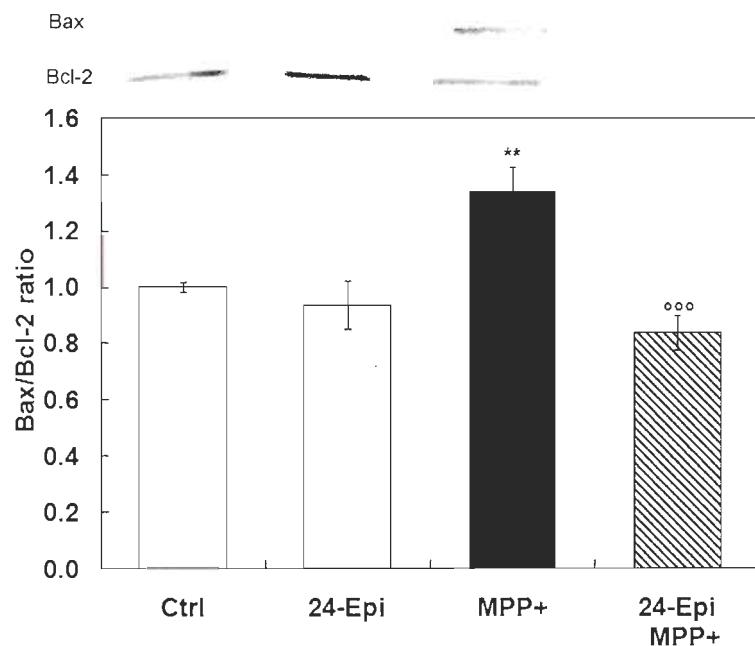


Figure 7



CHAPITRE IV

CONCLUSION

Malgré les progrès considérables au niveau de la description, de l'évolution et du traitement de la MP, on ignore encore la cause de la dégénérescence des neurones DAergiques au niveau de la pcSN conduisant au déficit en DA. Heureusement, plusieurs médicaments sont disponibles pour pallier le manque en DA. Ces traitements aident à contrôler, en partie, les symptômes moteurs de cette maladie et permettent ainsi de conserver une qualité de vie pendant plusieurs années. Toutefois, à ce jour aucun médicament ne peut prévenir, ralentir ou arrêter la progression de la MP. Ainsi, tel que décrit dans mon introduction, de plus en plus de recherches se concentrent sur le développement de stratégies neuroprotectrices afin de prévenir la neurodégénérescence.

Le stress oxydant étant un facteur fréquemment évoqué dans l'étiologie des maladies neurodégénératives, plusieurs études épidémiologiques suggèrent que le régime alimentaire et la consommation d'antioxydants pourraient influencer l'incidence de ces maladies. Mon projet de recherche se concentre d'ailleurs sur l'étude du potentiel neuroprotecteur du 24-épi, un phytostérol présent dans la gourgane. L'objectif général de cette étude consistait donc à évaluer si sa consommation pouvait mener à long terme au développement d'une approche thérapeutique antioxydante visant la prévention de la neurodégénérescence.

Le potentiel neuroprotecteur du 24-épi a été étudié via sa capacité à protéger les neurones DAergiques du stress oxydant et de l'apoptose induits par la toxine MPP⁺. Ce phytostérol étant peu étudié chez les mammifères, les résultats du test de cytotoxicité mesurée par la libération de la lactate déshydrogénase (LDH) ont permis de montrer que le 24-épi n'est pas toxique et qu'il renverse, en partie, la neurodégénérescence induite par le MPP⁺. De plus,

la capacité du 24-épi à neutraliser les radicaux libres a été observée à l'aide de la DHR 123 et de MitoSoxTM, deux molécules qui deviennent fluorescentes en présence de divers ROS. Ainsi, ces tests ont permis de confirmer que le 24-épi a effectivement la capacité de diminuer le niveau intracellulaire de ROS induits par le MPP⁺, une toxine qui provoque une production importante de radicaux libres. De plus, nos recherches ont permis d'observer si la diminution de ROS provoquée par le 24-épi est induite par sa capacité à moduler l'activité des enzymes antioxydantes SOD, CAT et GPx. La SOD a pour rôle d'éliminer les O₂⁻ via une réaction de dismutation qui produit du H₂O₂, qui est à son tour détoxifié par la CAT et la GPx. Ces enzymes antioxydantes sont donc essentielles afin de contrôler la quantité intracellulaire de radicaux libres. Ainsi, tout comme le MPP⁺, le 24-épi augmente l'activité de ces enzymes antioxydantes. Cependant, les résultats des expérimentations à la DHR 123 et au MitoSoxTM suggèrent que l'augmentation induite par le 24-épi correspond à un effet neuroprotecteur tandis que la hausse de l'activité induite par le MPP⁺ serait une réaction d'adaptation face au stress oxydant. Ainsi, contrairement au 24-épi, la modulation à la hausse de l'activité des enzymes SOD, CAT et GPx provoquée par le MPP⁺ demeure insuffisante pour contrer l'augmentation de production de ROS et l'état de stress oxydant persiste (Cassarino et al. 1997; Esposito et al. 2002; Lahaie-Collins et al. 2008; Thomas et al. 2008). Plusieurs études ont d'ailleurs montré que certaines molécules naturelles ont la capacité de moduler l'activité et l'expression des enzymes antioxydantes, notamment les polyphénols et les vitamines (Fang et al. 2002; Lahaie-Collins et al. 2008; Masella et al. 2005; Stevenson and Hurst 2007; Virgili and Marino 2008).

Nos résultats montrent aussi que l'activité de la CAT et de la GPx sont modulées différemment selon le niveau de stress oxydant. Ainsi, comme il a été suggéré précédemment, la GPx est une source importante de protection contre les faibles niveaux de stress oxydant tandis que la CAT aurait un rôle plus important dans la protection contre les hauts niveaux de stress oxydant (Halliwell 2006; Masella et al. 2005; Mates and Sanchez-Jimenez

1999). Puisque le stress oxydant est un facteur fréquemment évoqué dans l'étiologie de la MP, la capacité du 24-épi à protéger les neurones DAergiques du stress oxydant nous incite à étudier ses propriétés antioxydantes plus en profondeur.

Cette étude a également permis de montrer que les effets antioxydants du 24-épi inhibent l'apoptose induite par la MPP⁺. Ainsi, les résultats montrent clairement que le MPP⁺ induit une mort cellulaire par apoptose, notamment en induisant la fragmentation de l'ADN, l'activation de la caspase-3 et la hausse du ratio de l'expression des protéines Bax/Bcl-2. Tel qu'expliqué ci-dessous, ces trois paramètres fondamentaux permettent de prouver la présence d'une mort cellulaire par apoptose. Le 24-épi augmente l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, qui possède un rôle important dans la prévention du déclenchement du processus apoptotique. Ce brassino diminue également l'expression de la protéine Bax, un facteur pro-apoptotique. Il a été montré que le ratio des protéines pro- et anti-apoptotiques, notamment Bax et Bcl-2, déterminent la réponse face à un signal de mort cellulaire (Gross et al. 1998). Ainsi, la capacité du 24-épi à diminuer le ratio de l'expression des protéines Bax/Bcl-2 lui confère un potentiel anti-apoptotique. Cet effet anti-apoptotique a également été vérifié par l'étude de l'activation de la caspase-3 et de la fragmentation de l'ADN. L'activation de la caspase-3 est une étape clé de l'apoptose puisqu'une fois activée, elle catalyse le clivage spécifique de certaines protéines intracellulaires qui activent le processus de fragmentation de l'ADN (Porter and Janicke 1999). Nos résultats ont permis de montrer que le 24-épi prévient l'activation de la caspase-3 et la fragmentation de l'ADN induites par le MPP⁺. Enfin, nous avons montré qu'un pré-traitement au 24-épi permet de prévenir la mort neuronale apoptotique induite par le MPP⁺. Sachant que plusieurs recherches montrent la présence de marqueurs apoptotiques dans les neurones DAergiques de patients parkinsoniens (Hartmann et al. 2000; Hartmann et al. 2001b; Hartmann et al. 2001a; Mogi et al. 2000; Tatton 2000),

notamment l'augmentation de l'activation des caspases et de l'expression de la protéine Bax, le potentiel anti-apoptotique du 24-épi s'avère très intéressant.

Ainsi, par le biais de mon projet de recherche, j'ai montré pour la première fois le potentiel antioxydant et neuroprotecteur du 24-épi contre le stress oxydant induit dans une ligné de cellules DAergiques de mammifère. En effet, par son potentiel antioxydant et anti-apoptotique, le 24-épi prévient la dégénérescence neuronale induite par le MPP⁺. Ce projet de recherche suggère donc que le 24-épi possède un fort potentiel neuroprotecteur et pourrait mener à long terme au développement d'une thérapie préventive visant la prévention de la neurodégénérescence.

Présentement, les traitements de la MP se concentrent sur le contrôle des symptômes moteurs provoqués par la perte des neurones DAergiques dans la pcSN. Malgré que ces traitements permettent de diminuer la morbidité et la mortalité reliées à la MP (Schapira 2005), plusieurs études se concentrent désormais sur le développement de nouvelles thérapies neuroprotectrices (Esposito et al. 2002; Lohle and Reichmann 2010; Mandel et al. 2003). D'un point de vue clinique, la neuroprotection est définie comme étant la prévention ou le ralentissement de l'apparition ou de l'évolution de la neurodégénérescence (Lewitt and Taylor 2008). Plusieurs agents neuroprotecteurs sont présentement étudiés, notamment la mélatonine, le sélénium, les vitamines A, C et E, les phytostérols et la nicotine (Mandel et al. 2003; Singh et al. 2007). Ces molécules sont à l'étude puisqu'elles sont caractérisées par un fort potentiel antioxydant. Spécifiquement, la mélatonine est reconnue par sa capacité à capter les radicaux libres (Mayo et al. 2005; Srinivasan et al. 2005), le sélénium prévient la neurodégénérescence en modulant l'enzyme antioxydante GPx (Chen and Berry 2003; Zafar et al. 2003) tandis que les vitamines et les polyphénols préviennent les dommages induits par les ROS en neutralisant les radicaux libres (Esposito et al. 2002; Singh et al. 2007; Stevenson and Hurst 2007; Virgili and Marino 2008).

La nicotine est une molécule largement étudiée puisque des recherches ont montré que ce composé prévient la neurodégénérescence des neurones DAergiques (Gorell et al. 1999; Quik 2004; Rusted et al. 2000). Son effet neuroprotecteur serait provoqué par le fait que la nicotine est un agoniste des récepteurs nicotinique, entraînant donc la relâche de DA dans le striatum. La nicotine est également reconnue pour sa capacité à capter les radicaux libres et à prévenir la peroxydation lipidique (Prasad et al. 1994; Quik and Kulak 2002). De plus, une étude réalisée sur des primates en 1998 (Schneider et al. 1998) a montré qu'un traitement combinant un agoniste nicotinique et la levodopa a un effet bénéfique sur les symptômes moteurs de la MP et réduit les fluctuations motrices. Malgré que les recherches supportent l'effet neuroprotecteur de la nicotine, aucun protocole clinique n'a encore été développé afin de traiter les patients parkinsoniens. Toutefois, l'efficacité des timbres transdermiques de nicotine, des gommes à la nicotine, du spray nasal à la nicotine qui sont utilisés pour traiter la dépendance à la nicotine ont été étudiés afin d'évaluer la possibilité de leur utilisation dans le cadre de la MP (Lemay et al. 2003; Lemay et al. 2004). Cependant, les patients ont ressentis des effets secondaires importants associés à ces traitements, notamment des nausées, des troubles gastro-intestinaux, de la congestion nasale et des irritations cutanées (Gourlay et al. 1999; Lemay et al. 2003; Lemay et al. 2004). Ces effets seraient induits par le manque de spécificité de la nicotine et des études supplémentaires sont donc nécessaires afin de développer une formulation qui concentre les effets de cette substance dans le système nerveux central.

Malgré que plusieurs molécules nécessitent des études plus approfondies afin de confirmer leur utilisation comme agent neuroprotecteur, certaines sont considérées plus intéressantes que d'autres. En effet, le "Committee to Identify Neuroprotective Agents in Parkinson's (CINAPS)" a identifié 20 molécules potentiellement neuroprotectrices qui seraient à prioriser dans les recherches futures (tableau 1.4) (Ravina et al. 2003). Parmi ces composés, on retrouve beaucoup de molécules reconnues pour leur fort potentiel antioxydant,

notamment la nicotine, la coenzyme Q₁₀, l'acide ascorbique et l'estrogène (Mandel et al. 2003; Singh et al. 2007). Ces composés ont été sélectionnés pour leur capacité à pénétrer la BHE et selon les données obtenues en études pré-cliniques et cliniques concernant la sécurité, la tolérance et l'efficacité du traitement (Ravina et al. 2003). Parmi ces molécules, plusieurs sont reconnues pour leur potentiel antioxydant et/ou anti-apoptotique (Esposito et al. 2002; Mandel et al. 2003; Singh et al. 2007).

TABLEAU 1.4
Molécules potentiellement neuroprotectrices visant à orienter les recherches futures sur les composés neuroprotecteurs selon le “Committee to Identify Neuroprotective Agents in Parkinson’s (CINAPS)” (Ravina et al. 2003)

Molécules à visée neuroprotectrices	
Acide ascorbique	GM-1 ganglioside*
Amantadine	Minocycline*
Azulenyl nitrone	Modafinil
Caféine*	N-acétylcystéine
Coenzyme Q ₁₀ *	Nicotine
Créatine*	Pramipexole*
Érythropoïétine	Ropinirole*
Estrogène*	Rasagiline*
Folate	Remacemide
GPI-1485*	Sélégiline*

*Candidats privilégiés à court-terme pour des études cliniques de phase II ou III.

Sachant que de plus en plus d'études suggèrent que les traitements qui visent la diminution du stress oxydant seraient la stratégie à adopter afin de prévenir et diminuer la progression de la neurodégénérescence, l'étude du 24-épi s'avère donc plus que justifiée. En effet, les résultats obtenus dans le cadre de ce projet de recherche montrent que ce brassino possède des propriétés antioxydantes et anti-apoptotiques, soient les mêmes caractéristiques que les molécules ciblées par le "CINAPS". De plus, par sa structure chimique semblable aux stéroïdes (Bajguz and Tretyn 2003; Clouse 2001), il est fort

probable que le 24-épi traverse la BHE. Des analyses ont également montré que le 24-épi n'est pas toxique pour les mammifères (Ikekawa and Zhao 1991; Khripach et al. 2000), suggérant donc la sécurité et la tolérance de ce composé. Ces particularités du 24-épi nous incitent donc à considérer cette molécule comme un agent potentiellement neuroprotecteur et il s'avère donc nécessaire d'effectuer des expérimentations supplémentaires afin d'étudier l'efficacité d'un tel traitement. À long terme, le 24-épi pourrait donc être sélectionné par le "CINAPS" comme étant une molécule à visée neuroprotectrice à prioriser dans les recherches traitant de neuroprotection clinique.

Pour compléter l'étude du potentiel antioxydant du 24-épi, il serait nécessaire d'observer si la hausse de l'activité des enzymes antioxydantes SOD, CAT et GPx est accompagnée par une augmentation de la transcription et de l'expression de ces protéines. Pour ce faire, les techniques de RT-PCR et d'immunobuvardage de type Western pourraient être utilisées. De plus, puisqu'il a été montré qu'une inhibition du complexe I de la mitochondrie serait une source importante de stress oxydant dans la MP (Dauer and Przedborski 2003; Esposito et al. 2002; Sherer et al. 2002), il serait aussi intéressant d'étudier si le 24-épi a la capacité de protéger les neurones de cette altération de l'activité mitochondriale. La mesure de l'activité du complexe I est une expérimentation exécutée dans des systèmes *in vivo* et *in vitro* depuis plusieurs années (Hatefi 1978; Ragan et al. 1987). Jusqu'à présent, l'effet d'un antioxydant sur l'activité du complexe I dans le cadre de la MP est un sujet peu étudié qui suscite beaucoup d'intérêt.

Des travaux futurs consisteraient également en une étude détaillée de l'effet anti-apoptotique du 24-épi à d'autres niveaux de la cascade apoptotique puisque ce processus consiste en un ensemble complexe d'interactions (Andreas Gewies 2003; Schultz and Harrington, Jr. 2003; Zhang et al. 2004). Par exemple, il serait intéressant de vérifier le potentiel du 24-épi à moduler la relâche du cyt c, l'activation de la protéine PARP-1 (poly (ADP-

ribose) polymérase) et la redistribution de la protéine AIF. Les techniques d'immunobuvardage de type Western et d'immunofluorescence pourraient être utilisées pour réaliser ces expérimentations.

De plus, sachant que le 24-épi possède une structure très similaire aux stéroïdes (Bajguz and Tretyn 2003; Clouse 2001), notamment l'estrogène, il est important d'étudier la modulation des récepteurs estrogènes (ER) plus particulièrement les récepteurs α ER et β ER. En effet, la modulation de l'expression de ces récepteurs peut induire des effets secondaires hormonaux importants (Chlebowski et al. 2003; The Women's Health Initiative Steering Committee 2004). Toutefois, des recherches ont montré que certains polyphénols sont caractérisés par un potentiel neuroprotecteur et cet effet est indépendant des propriétés estrogéniques de ces composés (Gagne et al. 2003; Lahaie-Collins et al. 2008). La modulation de l'expression et de la transcription de ces récepteurs par le 24-épi peuvent être vérifiées par les techniques d'immunobuvardage de type Western et de RT-PCR.

Finalement, suite à nos résultats obtenus par les expérimentations sur les PC12 neuronales, il serait nécessaire de réaliser des études *in vivo* afin de déterminer l'effet du 24-épi sur le système DAergique de souris. Les souris C57BL/6 constituent un bon modèle pour étudier la MP puisque leur système DAergique est sensible à la toxine MPTP (Sundström et al. 1990). Le MPTP est la toxine la plus utilisée afin de reproduire la dégénérescence des neurones DAergiques et représente donc un excellent modèle de recherche pour l'étude de la MP (Dauer and Przedborski 2003; Eberhardt and Schulz 2003). Cette toxine peut être administrée par injection répétée de façon intra-péritonéale ou sous-cutanée (Meredith et al. 2008). Le protocole généralement utilisé correspond à quatre injections par jour de MPTP à deux heures d'intervalle (Meredith et al. 2008). Afin de déterminer l'effet neuroprotecteur du 24-épi, il serait intéressant d'étudier l'expression la tyrosine hydroxylase (TH) dans la pcSN, l'enzyme précurseur de la DA. L'utilisation de la technique

d'immunofluorescence permettrait de dénombrer les neurones TH-positifs tandis qu'il serait possible de quantifier la TH via l'immunobuvardage de type Western.

Il serait également intéressant de vérifier l'effet de la combinaison de la L-dopa avec le 24-épi. À ce jour, la L-dopa est considérée comme le traitement le plus efficace pour contrôler les symptômes moteurs de la MP (Hauser 2009). Malgré les effets bénéfiques de ce composé, la majorité des patients développent des fluctuations motrices après environ 5 années de traitement (Ahlskog and Muenter 2001; Fahn 1999). Sachant que ces complications seraient provoquées par la perte progressive des neurones DAergiques et une stimulation pulsatile des récepteurs DAergiques (Abbruzzese 2008; Hauser 2009; Kedar 2003; Nutt 2008; Schapira 2005), un traitement combinant la dopathérapie et un agent neuroprotecteur serait prometteur. En effet, la dopathérapie permettrait de rétablir la quantité de DA dans le cerveau tandis qu'un agent qui prévient la neurodégénérescence permettrait de maintenir une quantité constante de neurones DAergiques résiduels. Il n'y aurait donc pas de diminution de L-dopa captée par ces neurones et la capacité de production, de stockage et de sécrétion de DA seraient constantes. Puisque nos résultats suggèrent que le 24-épi est un agent neuroprotecteur, l'étude comparative entre un traitement à la L-dopa et une thérapie combinant le 24-épi et la L-dopa s'avère très innovatrice. Les résultats obtenus seront peut-être comparables à ceux décrits par Spengos et Vassipoulos ainsi que par Kempster et al. (Kempster et al. 1993; Spengos and Vassilopoulos 1988), soit une amélioration des symptômes moteurs chez des patients parkinsoniens suivant l'ingestion de gourgane.

En résumé, ce projet de recherche a permis de monter le potentiel neuroprotecteur du 24-épi, via ses propriétés antioxydantes et anti-apoptotiques. Largement étudié pour sa capacité à protéger les végétaux de différents stress environnementaux (Ali et al. 2008; Bajguz and Hayat 2009; Sasse et al. 1995; Singh and Shono 2003), nos résultats suggèrent que ce

brassino possède les mêmes propriétés chez les mammifères. En effet, tout comme chez les plantes, le 24-épi module les enzymes antioxydantes et augmente donc la résistance des cellules face au stress oxydant. Sachant que le stress oxydant est impliqué dans de multiples maladies liées au vieillissement (Favier 2006; Mates and Sanchez-Jimenez 1999), les propriétés du 24-épi nous incitent à étudier le mécanisme d'action de cette molécule plus en profondeur. Les résultats obtenus supportent l'idée que les thérapies neuroprotectrices impliquant la consommation de composés antioxydants seraient l'approche thérapeutique à prioriser afin de prévenir les maladies neurodégénératives. Ainsi, une consommation d'antioxydants à long terme et de façon continue serait associée avec un risque plus faible de développer la MP (Esposito et al. 2002; Yacoubian and Standaert 2009). À ce propos, une diète caractérisée par une consommation d'aliments riches en antioxydants, notamment les fruits, les légumes, les poissons et les grains entiers, s'avère une solution simple qui n'engendre pas de coûts supplémentaires et permettrait de prévenir diverses maladies liées au vieillissement. Le 24-épi est donc une molécule neuroprotectrice très prometteuse puisqu'on la retrouve dans les végétaux cultivés au Québec et au Canada. Ce projet de recherche a donc permis de découvrir les effets d'un phytostérol peu connu contre le stress oxydant chez les mammifères. Les résultats obtenus nous incitent donc fortement à poursuivre nos études sur la neuroprotection induite par les phytostérols, plus particulièrement à approfondir nos connaissances sur la famille des brassinos, dont les nombreux effets chez les mammifères sont encore à découvrir.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abbruzzese,G. 2008. Optimising levodopa therapy. *Neurol.Sci.* **29 Suppl 5**: S377-S379.
2. Abdel-Salam,O.M. 2008. Drugs used to treat Parkinson's disease, present status and future directions. *CNS.Neurol.Disord.Drug Targets.* **7**: 321-342.
3. Ahlskog,J.E. and Muenter,M.D. 2001. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord.* **16**: 448-458.
4. Ali,B., Hayat,S., Fariduddin,Q., and Ahmad,A. 2008. 24-Epibrassinolide protects against the stress generated by salinity and nickel in *Brassica juncea*. *Chemosphere* **72**: 1387-1392.
5. Ambani,L.M., Van Woert,M.H., and Murphy,S. 1975. Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease. *Arch.Neurol.* **32**: 114-118.
6. Andersen,J.K. 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat.Med.* **10 Suppl**: S18-S25.
7. Andreas Gewies 2003. Introduction to Apoptosis. *ApoReview* 1-26.
8. Apaydin,H., Ertan,S., and Ozekmekci,S. 2000. Broad bean (*Vicia faba*)--a natural source of L-dopa--prolongs "on" periods in patients with Parkinson's disease who have "on-off" fluctuations. *Mov Disord.* **15**: 164-166.
9. Arthur,J.R. 2000. The glutathione peroxidases. *Cell Mol.Life Sci.* **57**: 1825-1835.
10. Bajguz,A. and Hayat,S. 2009. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol Biochem.* **47**: 1-8.
11. Bajguz,A. and Tretyn,A. 2003. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* **62**: 1027-1046.

12. Balaban,R.S., Nemoto,S., and Finkel,T. 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**: 483-495.
13. Beal,M.F., Matthews,R.T., Tielemans,A., and Shults,C.W. 1998. Coenzyme Q10 attenuates the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,tetrahydropyridine (MPTP) induced loss of striatal dopamine and dopaminergic axons in aged mice. *Brain Res.* **783**: 109-114.
14. Bobrick,A.O., Khripach,V.A., Zhabinskii,V.N., Zavadskaya,M.I., and Litvinovskaya,R.P. 1998. A method of production of sanitized seed potato. *Pat.Appl. BY 19,981,189*.
15. Bournival,J., Quessy,P., and Martinoli,M.G. 2009. Protective Effects of Resveratrol and Quercetin Against MPP(+) -Induced Oxidative Stress Act by Modulating Markers of Apoptotic Death in Dopaminergic Neurons. *Cell Mol.Neurobiol.* **29**: 1169-1180.
16. Callus,B.A. and Vaux,D.L. 2007. Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical. *Cell Death.Differ.* **14**: 73-78.
17. Cassarino,D.S., Fall,C.P., Swerdlow,R.H., Smith,T.S., Halvorsen,E.M., Miller,S.W., Parks,J.P., Parker,W.D., Jr., and Bennett,J.P., Jr. 1997. Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease. *Biochim.Biophys.Acta* **1362**: 77-86.
18. Cassarino,D.S., Parks,J.K., Parker,W.D., Jr., and Bennett,J.P., Jr. 1999. The parkinsonian neurotoxin MPP+ opens the mitochondrial permeability transition pore and releases cytochrome c in isolated mitochondria via an oxidative mechanism. *Biochim.Biophys.Acta* **1453**: 49-62.
19. Castilla,V., Larzabal,M., Sgalippa,N.A., Wachsman,M.B., and Coto,C.E. 2005. Antiviral mode of action of a synthetic brassinosteroid against Junin virus replication. *Antiviral Res.* **68**: 88-95.
20. Chase,T.N. 1998. The significance of continuous dopaminergic stimulation in the treatment of Parkinson's disease. *Drugs* **55 Suppl 1**: 1-9.

21. Chen,J. and Berry,M.J. 2003. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem.* **86**: 1-12.
22. Chlebowski,R.T., Hendrix,S.L., Langer,R.D., Stefanick,M.L., Gass,M., Lane,D., Rodabough,R.J., Gilligan,M.A., Cyr,M.G., Thomson,C.A., Khandekar,J., Petrovitch,H., and McTiernan,A. 2003. Influence of Estrogen Plus Progestin on Breast Cancer and Mammography in Healthy Postmenopausal Women: The Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA* **289**: 3243-3253.
23. Clouse,S. 2001. Brassinosteroids. *The Arabidopsis Book Jan 2008*: 1-23.
24. D'Amato,R.J., Lipman,Z.P., and Snyder,S.H. 1986. Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP⁺ binds to neuromelanin. *Science* **231**: 987-989.
25. D'Archivio,M., Filesi,C., Di,B.R., Gargiulo,R., Giovannini,C., and Masella,R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann.Ist.Super.Sanita* **43**: 348-361.
26. Dauer,W. and Przedborski,S. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**: 889-909.
27. De Kumar,A. and Rukmimi,D. 1988. Physiological antioxidants and antioxidative enzymes in vitamine E-deficient rats. *Toxicology Letters* **44**: 47-54.
28. Dexter,D.T., Brooks,D.J., Harding,A.E., Burn,D.J., Muller,D.P., Goss-Sampson,M.A., Jenner,P.G., and Marsden,C.D. 1994a. Nigrostriatal function in vitamin E deficiency: clinical, experimental, and positron emission tomographic studies. *Ann.Neurol.* **35**: 298-303.
29. Dexter,D.T., Nanayakkara,I., Goss-Sampson,M.A., Muller,D.P., Harding,A.E., Marsden,C.D., and Jenner,P. 1994b. Nigral dopaminergic cell loss in vitamin E deficient rats. *Neuroreport* **5**: 1773-1776.
30. Double,K.L. 2006. Functional effects of neuromelanin and synthetic melanin in model systems. *J Neural Transm.* **113**: 751-756.

31. Dringen,R. and Hirrlinger,J. 2003. Glutathione pathways in the brain. *Biol.Chem.* **384**: 505-516.
32. Ebadi,M., Muralikrishnan,D., Pellett,L.J., Murphy,T., and Drees,K. 2000. Ubiquinone (coenzyme Q10) and complex I in mitochondrial oxidative disorder of Parkinson's disease. *Proc.West Pharmacol.Soc.* **43**: 55-63.
33. Eberhardt,O. and Schulz,J.B. 2003. Apoptotic mechanisms and antiapoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease. *Toxicol.Lett.* **139**: 135-151.
34. Ekert,P.G., Silke,J., and Vaux,D.L. 1999. Caspase inhibitors. *Cell Death.Differ.* **6**: 1081-1086.
35. Esposito,E., Rotilio,D., Di Matteo,V., Di Giulio,C., Cacchio,M., and Algeri,S. 2002. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiology of Aging* **23**: 719-735.
36. Fahn,S. 1999. Parkinson disease, the effect of levodopa, and the ELLDOPA trial. Earlier vs Later L-DOPA. *Arch.Neurol.* **56**: 529-535.
37. Fahn,S. and Cohen,G. 1992. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann.Neurol.* **32**: 804-812.
38. Fahn,S. and Sulzer,D. 2004. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. *NeuroRx.* **1**: 139-154.
39. Fang,Y.Z., Yang,S., and Wu,G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **18**: 872-879.
40. Fariss,M.W. and Zhang,J.G. 2003. Vitamin E therapy in Parkinson's disease. *Toxicology* **189**: 129-146.
41. Favier,A. 2006. [Oxidative stress in human diseases]. *Ann.Pharm.Fr.* **64**: 390-396.

42. Fedorow,H., Tribl,F., Halliday,G., Gerlach,M., Riederer,P., and Double,K.L. 2005. Neuromelanin in human dopamine neurons: comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. *Prog.Neurobiol.* **75**: 109-124.
43. Ferrante,R.J., Andreassen,O.A., Dedeoglu,A., Ferrante,K.L., Jenkins,B.G., Hersch,S.M., and Beal,M.F. 2002. Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci.* **22**: 1592-1599.
44. Findley,L.J. 2007. The economic impact of Parkinson's disease. *Parkinsonism.Relat Disord.* **13 Suppl**: S8-S12.
45. Fiskum,G., Starkov,A., Polster,B.M., and Chinopoulos,C. 2003. Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **991**: 111-119.
46. Fujita,Y., Izawa,Y., Ali,N., Kanematsu,Y., Tsuchiya,K., Hamano,S., Tamaki,T., and Yoshizumi,M. 2006. Pramipexole protects against H₂O₂-induced PC12 cell death. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **372**: 257-266.
47. Gaëtan Garraux, Philippe Peigneux Richard E. Carson et Mark Hallett. (2008) "La dopamine au service du geste", Université de Liège, http://reflexions.ulg.ac.be/cms/c_13642/la-dopamine-au-service-du-geste?hlText=parkinson&part=1.
48. Gagne,B., Gelinas,S., Bureau,G., Lagace,B., Ramassamy,C., Chiasson,K., Valastro,B., and Martinoli,M.G. 2003. Effects of estradiol, phytoestrogens, and Ginkgo biloba extracts against 1-methyl-4-phenyl-pyridine-induced oxidative stress. *Endocrine.* **21**: 89-95.
49. Galpern,W.R. and Cudkowicz,M.E. 2007. Coenzyme Q treatment of neurodegenerative diseases of aging. *Mitochondrion.* **7 Suppl**: S146-S153.
50. Gao,J.X., Zhou,Y.Q., Zhang,R.H., Ma,X.L., and Liu,K.J. 2005. [Caspase-3 plays a required role in PC12 cell apoptotic death induced by roscovitine]. *Sheng Li Xue.Bao.* **57**: 755-760.

51. Gao,X., Chen,H., Fung,T.T., Logroscino,G., Schwarzschild,M.A., Hu,F.B., and Ascherio,A. 2007. Prospective study of dietary pattern and risk of Parkinson disease. *Am.J.Clin.Nutr.* **86**: 1486-1494.
52. Gavrieli,Y., Sherman,Y., and Ben-Sasson,S.A. 1992. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J.Cell Biol.* **119**: 493-501.
53. Gendreau, S., Corneau, L., and Coulombe, J. (2006) "Fève des marais", Institut des nutraceutiques et des aliments fonctionnels (INAF), Université Laval,
http://www.passeportsante.net/fr/Nutrition/EncyclopedieAliments/Fiche.aspx?doc=feve_marais_gourgane_nu.
54. Gilgun-Sherki,Y., Melamed,E., and Offen,D. 2001. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* **40**: 959-975.
55. Gorell,J.M., Rybicki,B.A., Johnson,C.C., and Peterson,E.L. 1999. Smoking and Parkinson's disease: a dose-response relationship. *Neurology* **52**: 115-119.
56. Gourlay,S.G., Forbes,A., Marriner,T., and McNeil,J.J. 1999. Predictors and timing of adverse experiences during transdermal nicotine therapy. *Drug Saf* **20**: 545-555.
57. Graham,D.G. 1978. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol.Pharmacol.* **14**: 633-643.
58. Greene,L.A., Aletta,J.M., Rukenstein,A., and Green,S.H. 1987. PC12 pheochromocytoma cells: culture, nerve growth factor treatment, and experimental exploitation. *Methods Enzymol.* **147**: 207-216.
59. Greene,L.A. and Rein,G. 1977. Release, storage and uptake of catecholamines by a clonal cell line of nerve growth factor (NGF) responsive pheo-chromocytoma cells. *Brain Res.* **129**: 247-263.

60. Greene,L.A. and Tischler,A.S. 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **73**: 2424-2428.
61. Gross,A., Jockel,J., Wei,M.C., and Korsmeyer,S.J. 1998. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* **17**: 3878-3885.
62. Halliwell,B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J.Neurochem.* **97**: 1634-1658.
63. Harman,D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J.Gerontol.* **11**: 298-300.
64. Hartmann,A., Hunot,S., Michel,P.P., Muriel,M.P., Vyas,S., Faucheu,B.A., Mouatt-Prigent,A., Turmel,H., Srinivasan,A., Ruberg,M., Evan,G.I., Agid,Y., and Hirsch,E.C. 2000. 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* **97**: 2875-2880.
65. Hartmann,A., Michel,P.P., Troadec,J.D., Mouatt-Prigent,A., Faucheu,B.A., Ruberg,M., Agid,Y., and Hirsch,E.C. 2001a. Is Bax a mitochondrial mediator in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? *J.Neurochem.* **76**: 1785-1793.
66. Hartmann,A., Troadec,J.D., Hunot,S., Kikly,K., Faucheu,B.A., Mouatt-Prigent,A., Ruberg,M., Agid,Y., and Hirsch,E.C. 2001b. Caspase-8 is an effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, but pathway inhibition results in neuronal necrosis. *J.Neurosci.* **21**: 2247-2255.
67. Hatefi,Y. 1978. Preparation and properties of NADH: ubiquinone oxidoreductase (complexI), EC 1.6.5.3. *Methods Enzymol.* **53**: 11-14.
68. Hauser,R.A. 2009. Levodopa: past, present, and future. *Eur.Neurol.* **62**: 1-8.
69. Hauser,R.A. and Zesiewicz,T.A. 2006. Clinical trials aimed at detecting neuroprotection in Parkinson's disease. *Neurology* **66**: S58-S68.

70. Ikekawa,N. and Zhao,Y.J. 1991. Application of 24-Epibrassinolide in Agriculture. In Brassinosteroids:Chemistry, Bioactivity and Applications. Edited by American Chemical Society. Washington pp. 280-291.
71. Jankovic,J. 2002. Levodopa strengths and weaknesses. Neurology **58**: S19-S32.
72. Jenner,P. 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. Ann.Neurol. **53 Suppl 3**: S26-S36.
73. Johnson,F. and Giulivi,C. 2005. Superoxide dismutases and their impact upon human health. Mol.Aspects Med. **26**: 340-352.
74. Kannan,K. and Jain,S.K. 2000. Oxidative stress and apoptosis. Pathophysiology. **7**: 153-163.
75. Kedar,N.P. 2003. Can we prevent Parkinson's and Alzheimer's disease? J Postgrad.Med. **49**: 236-245.
76. Kempster,P.A., Bogetic,Z., Secombei,J.W., Martin,H.D., Balazs,N.D.H., and Wahlgqvist,M.L. 1993. Motor effects of broad beans (*Vicia faba*) in Parkinson's disease:single dose studies. Asia Pacific J Clin Nutr **2**: 85-89.
77. Khripach,V., Zhabinskii,V., and de Groot,A. 2000. Twenty years of brassinosteroids: Steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. Annals of Botany **86**: 441-447.
78. Kontakos,N. and Stokes,J. 1999. Monograph series on aging-related diseases: XII. Parkinson's disease--recent developments and new directions. Chronic.Dis.Can. **20**: 58-76.
79. Krishna,P. 2003. Brassinosteroid-Mediated Stress Responses. J.Plant Growth Regul. **22**: 289-297.
80. Kroemer,G., Zamzami,N., and Susin,S.A. 1997. Mitochondrial control of apoptosis. Immunol.Today **18**: 44-51.

81. Kunikowska,G. and Jenner,P. 2003. 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.* **968**: 206-218.
82. Lahaie-Collins,V., Bournival,J., Plouffe,M., Carange,J., and Martinoli,M.G. 2008. Sesamin modulates tyrosine hydroxylase, superoxide dismutase, catalase, inducible NO synthase and interleukin-6 expression in dopaminergic cells under MPP-induced oxidative stress. *Oxid.Med.Cell Longev.* **1**: 54-62.
83. Lees,A.J., Hardy,J., and Revesz,T. 2009. Parkinson's disease. *Lancet* **373**: 2055-2066.
84. Lemay,S., Blanchet,P., Chouinard,S., Masson,H., Soland,V., and Bedard,M.A. 2003. Poor tolerability of a transdermal nicotine treatment in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol.* **26**: 227-229.
85. Lemay,S., Chouinard,S., Blanchet,P., Masson,H., Soland,V., Beuter,A., and Bedard,M.A. 2004. Lack of efficacy of a nicotine transdermal treatment on motor and cognitive deficits in Parkinson's disease. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* **28**: 31-39.
86. Levy,O.A., Malagelada,C., and Greene,L.A. 2009. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis*. **14**: 478-500.
87. Lewitt,P.A. and Taylor,D.C. 2008. Protection against Parkinson's disease progression: clinical experience. *Neurotherapeutics*. **5**: 210-225.
88. Lohle,M. and Reichmann,H. 2010. Clinical neuroprotection in Parkinson's disease - still waiting for the breakthrough. *J Neurol.Sci.* **289**: 104-114.
89. Longo,R., Castellani,A., Sberze,P., and Tibolla,M. 1974. Distribution of L-DOPA and related amino acid in Vicia. *Phytochem* **13**: 167-171.
90. Lotharius,J. and Brundin,P. 2002. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat.Rev.Neurosci.* **3**: 932-942.

91. Malikova,J., Swaczynova,J., Kolar,Z., and Strnad,M. 2008. Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry* **69**: 418-426.
92. Mandel,S., Grunblatt,E., Riederer,P., Gerlach,M., Levites,Y., and Youdim,M.B. 2003. Neuroprotective strategies in Parkinson's disease : an update on progress. *CNS.Drugs* **17**: 729-762.
93. Marttila,R.J., Lorentz,H., and Rinne,U.K. 1988. Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease. Increase of superoxide dismutase-like activity in the substantia nigra and basal nucleus. *J.Neurol.Sci.* **86**: 321-331.
94. Masella,R., Di,B.R., Vari,R., Filesi,C., and Giovannini,C. 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem.* **16**: 577-586.
95. Mates,J.M. and Sanchez-Jimenez,F. 1999. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci.* **4**: D339-D345.
96. Matthews,R.T., Yang,L., Browne,S., Baik,M., and Beal,M.F. 1998. Coenzyme Q10 administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**: 8892-8897.
97. Mayo,J.C., Sainz,R.M., Tan,D.X., Antolin,I., Rodriguez,C., and Reiter,R.J. 2005. Melatonin and Parkinson's disease. *Endocrine*. **27**: 169-178.
98. Meredith,G.E., Sonsalla,P.K., and Chesselet,M.F. 2008. Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta Neuropathol.* **115**: 385-398.
99. Michelini,F.M., Ramirez,J.A., Berra,A., Galagovsky,L.R., and Alche,L.E. 2004. In vitro and in vivo antiherpetic activity of three new synthetic brassinosteroid analogues. *Steroids* **69**: 713-720.

100. Miyasaki,J.M., Martin,W., Suchowersky,O., Weiner,W.J., and Lang,A.E. 2002. Practice parameter: initiation of treatment for Parkinson's disease: an evidence-based review: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* **58**: 11-17.
101. Mizuno,Y., Hattori,N., Kubo,S., Sato,S., Nishioka,K., Hatano,T., Tomiyama,H., Funayama,M., Machida,Y., and Mochizuki,H. 2008. Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease. *Philos.Transt.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **363**: 2215-2227.
102. Mogi,M., Togari,A., Kondo,T., Mizuno,Y., Komure,O., Kuno,S., Ichinose,H., and Nagatsu,T. 2000. Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. *J.Neural Transm.* **107**: 335-341.
103. Nicotra,A. and Parvez,S. 2002. Apoptotic molecules and MPTP-induced cell death. *Neurotoxicol.Teratol.* **24**: 599-605.
104. Nutt,J.G. 2008. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of levodopa. *Mov Disord.* **23 Suppl 3**: S580-S584.
105. Obeso,J.A., Rodriguez-Oroz,M.C., Chana,P., Lera,G., Rodriguez,M., and Olanow,C.W. 2000. The evolution and origin of motor complications in Parkinson's disease. *Neurology* **55**: S13-S20.
106. Olanow,C.W., Brin,M.F., and Obeso,J.A. 2000. The role of deep brain stimulation as a surgical treatment for Parkinson's disease. *Neurology* **55**: S60-S66.
107. Olanow,C.W., Obeso,J.A., and Stocchi,F. 2006. Continuous dopamine-receptor treatment of Parkinson's disease: scientific rationale and clinical implications. *Lancet Neurol.* **5**: 677-687.
108. Olanow,C.W., Perl,D.P., DeMartino,G.N., and McNaught,K.S. 2004. Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis. *Lancet Neurol.* **3**: 496-503.
109. Parker,W.D., Jr., Boyson,S.J., and Parks,J.K. 1989. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann.Neurol.* **26**: 719-723.

110. Pearce,R.K., Owen,A., Daniel,S., Jenner,P., and Marsden,C.D. 1997. Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J.Neural Transm.* **104**: 661-677.
111. Petit,H., Allain,H., and Vermersch,P. 1994. *La maladie de Parkinson; clinique et thérapeutique*. Masson, Paris, France.
112. Porter,A.G. and Janicke,R.U. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death.Differ.* **6**: 99-104.
113. Prasad,C., Ikegami,H., Shimizu,I., and Onaivi,E.S. 1994. Chronic nicotine intake decelerates aging of nigrostriatal dopaminergic neurons. *Life Sci.* **54**: 1169-1184.
114. Prasad,K.N., Cole,W.C., and Kumar,B. 1999. Multiple antioxidants in the prevention and treatment of Parkinson's disease. *J Am.Coll.Nutr* **18**: 413-423.
115. Quik,M. 2004. Smoking, nicotine and Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* **27**: 561-568.
116. Quik,M. and Kulak,J.M. 2002. Nicotine and nicotinic receptors; relevance to Parkinson's disease. *Neurotoxicology* **23**: 581-594.
117. Rabey,J.M., Vered,Y., Shabtai,H., Graff,E., Harsat,A., and Korczyn,A.D. 1993. Broad bean (*Vicia faba*) consumption and Parkinson's disease. *Adv.Neurol.* **60**: 681-684.
118. Ragan,C.I., Wilson,M.T., Darley-Usmar,V.M., and Lowe,P.N. 1987. Subfractionation of mitochondria and isolation of the proteins of oxidative phosphorylation. *Mitochondria, a Practical Approach* 79-112.
119. Rajendran,P.R., Thompson,R.E., and Reich,S.G. 2001. The use of alternative therapies by patients with Parkinson's disease. *Neurology* **57**: 790-794.

120. Ravina,B.M., Fagan,S.C., Hart,R.G., Hovinga,C.A., Murphy,D.D., Dawson,T.M., and Marler,J.R. 2003. Neuroprotective agents for clinical trials in Parkinson's disease: a systematic assessment. *Neurology* **60**: 1234-1240.
121. Rezak,M. 2007. Current pharmacotherapeutic treatment options in Parkinson's disease. *Dis.Mon.* **53**: 214-222.
122. Riederer,P., Sofic,E., Rausch,W.D., Schmidt,B., Reynolds,G.P., Jellinger,K., and Youdim,M.B. 1989. Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J.Neurochem.* **52**: 515-520.
123. Rubin,S.M. 2007. Parkinson's disease in women. *Dis.Mon.* **53**: 206-213.
124. Rusted,J.M., Newhouse,P.A., and Levin,E.D. 2000. Nicotinic treatment for degenerative neuropsychiatric disorders such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Behav.Brain Res.* **113**: 121-129.
125. Saggu,H., Cooksey,J., Dexter,D., Wells,F.R., Lees,A., Jenner,P., and Marsden,C.D. 1989. A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra. *J.Neurochem.* **53**: 692-697.
126. Salganik,R.I. 2001. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *J.Am.Coll.Nutr.* **20**: 464S-472S.
127. Sasse,J.M., Smith,R., and Hudson,I. 1995. Effect of 24-epibrassinolide on germination of seed of *Eucalyptus camaldulensis* in saline conditions. *Proc.Plant Growth Regul.* **22**: 136-141.
128. Schapira,A.H. 2005. Present and future drug treatment for Parkinson's disease. *J Neurol.Neurosurg.Psychiatry* **76**: 1472-1478.
129. Schapira,A.H., Cooper,J.M., Dexter,D., Jenner,P., Clark,J.B., and Marsden,C.D. 1989. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* **1**: 1269.

130. Schneider,J.S., Pope-Coleman,A., Van,V.M., Menzaghi,F., and Lloyd,G.K. 1998. Effects of SIB-1508Y, a novel neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonist, on motor behavior in parkinsonian monkeys. *Mov Disord.* **13**: 637-642.
131. Schultz,D.R. and Harrington,W.J., Jr. 2003. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin.Arthritis Rheum.* **32**: 345-369.
132. Sgonc,R. and Gruber,J. 1998. Apoptosis detection: an overview. *Exp.Gerontol.* **33**: 525-533.
133. Sherer,T.B., Betarbet,R., and Greenamyre,J.T. 2002. Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. *Neuroscientist.* **8**: 192-197.
134. Shults,C.W., Flint,B.M., Song,D., and Fontaine,D. 2004. Pilot trial of high dosages of coenzyme Q10 in patients with Parkinson's disease. *Exp.Neurol.* **188**: 491-494.
135. Shults,C.W., Haas,R.H., Passov,D., and Beal,M.F. 1997. Coenzyme Q10 levels correlate with the activities of complexes I and II/III in mitochondria from parkinsonian and nonparkinsonian subjects. *Ann.Neurol.* **42**: 261-264.
136. Shults,C.W., Oakes,D., Kieburz,K., Beal,M.F., Haas,R., Plumb,S., Juncos,J.L., Nutt,J., Shoulson,I., Carter,J., Kompoliti,K., Perlmutter,J.S., Reich,S., Stern,M., Watts,R.L., Kurlan,R., Molho,E., Harrison,M., and Lew,M. 2002. Effects of coenzyme Q10 in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline. *Arch.Neurol.* **59**: 1541-1550.
137. Singh,I. and Shono,M. 2003. Effect of 24-epibrassinolide on pollen viability during heat-stress in tomato. *Indian J.Exp.Biol.* **41**: 174-176.
138. Singh,N., Pillay,V., and Choonara,Y.E. 2007. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Prog.Neurobiol.* **81**: 29-44.
139. Sofic,E., Lange,K.W., Jellinger,K., and Riederer,P. 1992. Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci.Lett.* **142**: 128-130.

140. Sofic,E., Sapcanin,A., Tahirovic,I., Gavrankapetanovic,I., Jellinger,K., Reynolds,G.P., Tatschner,T., and Riederer,P. 2006. Antioxidant capacity in postmortem brain tissues of Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J.Neural Transm.Suppl.* **71**: 39-43.
141. Spengos, M. and Vassilopoulos, D. Improvement of Parkinson's disease after Vicia faba consumption. Book of abstracts, 9th International Symposium on Parkinson's Disease , 46. 1988. Ref Type: Abstract
142. Srinivasan,V., Pandi-Perumal,S.R., Maestroni,G.J., Esquifino,A.I., Hardeland,R., and Cardinali,D.P. 2005. Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotox.Res.* **7**: 293-318.
143. Stevenson,D.E. and Hurst,R.D. 2007. Polyphenolic phytochemicals--just antioxidants or much more? *Cell Mol.Life Sci.* **64**: 2900-2916.
144. Stocchi,F. 2009. Dopamine receptor agonists in the treatment of advanced Parkinson's disease. *Parkinsonism.Relat Disord.* **15 Suppl 4**: S54-S57.
145. Suchowersky,O., Gronseth,G., Perlmutter,J., Reich,S., Zesiewicz,T., and Weiner,W.J. 2006. Practice Parameter: neuroprotective strategies and alternative therapies for Parkinson disease (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* **66**: 976-982.
146. Sundström,E., Fredriksson,A., and Archer,T. 1990. Chronic neurochemical and behavioral changes in MPTP-lesioned C57BL/6 mice: a model for Parkinson's disease. *Brain Research* **528**: 181-188.
147. Tanner,C.M. 1992. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol.Clin* **10**: 317-329.
148. Tatton,N.A. 2000. Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. *Exp.Neurol.* **166**: 29-43.
149. The Parkinson Study Group 1993. Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. *N Engl.J Med.* **328**: 176-183.

150. The Women's Health Initiative Steering Committee 2004. Effects of Conjugated Equine Estrogen in Postmenopausal Women With Hysterectomy: The Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. *JAMA* **291**: 1701-1712.
151. Thomas,B., Saravanan,K.S., and Mohanakumar,K.P. 2008. In vitro and in vivo evidences that antioxidant action contributes to the neuroprotective effects of the neuronal nitric oxide synthase and monoamine oxidase-B inhibitor, 7-nitroindazole. *Neurochem.Int.* **52**: 990-1001.
152. Uttara,B., Singh,A.V., Zamboni,P., and Mahajan,R.T. 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr.Neuropharmacol.* **7**: 65-74.
153. Van Den Eeden,S.K., Tanner,C.M., Bernstein,A.L., Fross,R.D., Leimpeter,A., Bloch,D.A., and Nelson,L.M. 2003. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am.J.Epidemiol.* **157**: 1015-1022.
154. Vanderheyden,J.-É. and Bouilliez,D.-J. 2004. Traiter le Parkinson. Bruxelles, Belgique.
155. Vila,M. and Przedborski,S. 2004. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat.Med.* **10 Suppl**: S58-S62.
156. Virgili,F. and Marino,M. 2008. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radic.Biol.Med.* **45**: 1205-1216.
157. Viswanath,V., Wu,Y., Boonplueang,R., Chen,S., Stevenson,F.F., Yantiri,F., Yang,L., Beal,M.F., and Andersen,J.K. 2001. 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.* **21**: 9519-9528.
158. Wachsman,M.B., Ramirez,J.A., Talarico,L.B., Galagovsky,L.R., and Coto,C.E. 2004. Antiviral Activity of Natural and Synthetic Brassinosteroids. *Curr.Med.Chem.- Anti-Infective Agents* **3**: 163-179.

159. Wakabayashi,K., Tanji,K., Mori,F., and Takahashi,H. 2007. The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology*. **27**: 494-506.
160. Wardman,P. 2007. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic.Biol.Med.* **43**: 995-1022.
161. Weintraub,D., Comella,C.L., and Horn,S. 2008a. Parkinson's disease-- Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment. *Am.J.Manag.Care* **14**: S40-S48.
162. Weintraub,D., Comella,C.L., and Horn,S. 2008b. Parkinson's disease-- Part 2: Treatment of motor symptoms. *Am.J Manag.Care* **14**: S49-S58.
163. Wrona,M., Patel,K., and Wardman,P. 2005. Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radic.Biol.Med.* **38**: 262-270.
164. Yacoubian,T.A. and Standaert,D.G. 2009. Targets for neuroprotection in Parkinson's disease. *Biochim.Biophys.Acta* **1792**: 676-687.
165. Youdim,M.B. and Riederer,P. 1997. Understanding Parkinson's disease. *Sci.Am.* **276**: 52-59.
166. Zafar,K.S., Siddiqui,A., Sayeed,I., Ahmad,M., Salim,S., and Islam,F. 2003. Dose-dependent protective effect of selenium in rat model of Parkinson's disease: neurobehavioral and neurochemical evidences. *J Neurochem.* **84**: 438-446.
167. Zagnoli,F. and Rouhart,F. 2006. *Maladie de Parkinson*. Doin éditeurs, Paris, France.
168. Zamzami,N., Marchetti,P., Castedo,M., Decaudin,D., Macho,A., Hirsch,T., Susin,S.A., Petit,P.X., Mignotte,B., and Kroemer,G. 1995. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J.Exp.Med.* **182**: 367-377.

169. Zhang,A., Wu,Y., Lai,H.W.L., and Yew,D.T. 2004. Apoptosis - A Brief Review. *Neuroembryology* **3**: 47-59.
170. Zhou,C., Huang,Y., and Przedborski,S. 2008. Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1147**: 93-104.