

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE DE RECHERCHE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR
BENOÎT GAGNÉ, B. Sc. (Biologie Médicale)

**ÉTUDE DE L'EFFET NEUROPROTECTEUR DES PHYTOESTROGÈNES
SUR LE STRESS OXYDATIF EN CULTURE CELLULAIRE**

NOVEMBRE 2003

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

J'aimerais d'abord remercier le docteur Martinoli pour m'avoir premièrement donné ma chance et par la suite m'avoir encouragé à poursuivre mes études vers un cycle supérieur. J'aimerais aussi la remercier pour m'avoir montré ce qu'est l'enseignement universitaire. Ensuite, j'aimerais remercier mes collègues de laboratoire pour avoir supporté mes nombreuses blagues et aussi pour l'aide qu'ils m'ont apportée. Merci à Keith, Sylvie, Bruno et les stagiaires. Merci aux filles de chez Guy pour m'avoir tenu à l'affût de nombreux potins.

J'aimerais terminer en remerciant mon père pour les Jeudis à « La Belle Province », ma mère pour les nombreux encouragements, Véro pour avoir enduré ma guitare. Bref, merci à tous ceux qui ont cru en moi et je vous encourage tous à poursuivre vos rêves! Dans mon cas, n'ayez crainte, je saurai continuer sans problème!

RÉSUMÉ

La maladie de Parkinson, comme bien d'autres maladies neurodégénératives, est d'étiologie inconnue. Toutefois, l'implication des radicaux libres dans la pathogenèse de cette maladie semble des plus probables. Ils attaquaient les lipides membranaires, les organites et l'ADN des neurones de la substance noire mésencéphalique entraînant ainsi leur mort. La conséquence directe de cette mort neuronale est une diminution du taux de dopamine dans le système de régulation motrice nigrostriatale, ce qui mène aux tremblements caractéristiques de la maladie. À ce jour, il est encore impossible de guérir de cette démence. Il est cependant possible de prévenir cette attaque de radicaux libres. En effet, l'estradiol peut agir comme anti-oxydant et permettre une meilleure survie en présence de radicaux libres. Toutefois, comme cette hormone possède des récepteurs dans tout l'organisme, il est possible d'observer des effets secondaires suite à son utilisation. Nos recherches proposent l'utilisation de certains phytoestrogènes qui sembleraient offrir une protection similaire à celle offerte par l'estradiol, mais sans entraîner les effets hormonaux de cette dernière.

L'effet anti-oxydant des phytoestrogènes a été mesuré sur des cellules PC12 traitées avec des phytoestrogènes, soit le kaempférol, la quercitine et deux extraits de *Ginkgo biloba* (Egb761 et Cp202), puis soumises à des toxines (MPP+, Paraquat) connues pour induire la production de radicaux libres et/ou la mort cellulaire. L'efficacité de ces phytoestrogènes a été faite par l'évaluation de la cytotoxicité grâce au dosage de la lactate déhydrogénase (LDH). Le taux d'expression de certaines protéines clés dans la neuroprotection a été évalué grâce à la technique d'immunobuvardage de type « Western Blot ». Des résultats complémentaires utilisant le marquage des radicaux libres à l'intérieur des cellules ont été obtenus par l'oxydation de la dihydrorhodamine 123.

Les résultats que nous avons obtenus semblent démontrer un effet neuroprotecteur des phytoestrogènes. En effet, les cellules traitées avec les composés

ont résisté en plus grand nombre au stress induit par le MPP+. De plus, ces mêmes cellules contenaient beaucoup moins de radicaux libres que celles non traitées par les extraits. Par ailleurs, les phytoestrogènes modulent l'expression de protéines habituellement responsables de la prolifération et/ou de la protection cellulaire, ce qui suggère que les extraits utilisés sont capables de prévenir la mort cellulaire. De plus, le marquage à la dihydrorhodamine 123 suggère la capacité des phytoestrogènes à capter directement les radicaux libres, de les neutraliser, et ainsi de favoriser la survie cellulaire.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	II
RÉSUMÉ.....	III
TABLE DES MATIÈRES	V
TABLE DES FIGURES.....	VII
CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
1.1 LA MALADIE DE PARKINSON	1
1.1.1 <i>Aspects cliniques</i>	1
1.1.2 <i>Étiologie</i>	2
1.1.3 <i>Neurophysiologie</i>	3
1.1.3.1 Récepteurs dopaminergiques	4
1.1.3.2 Transport de la DA	4
1.1.4 <i>Physiopathologie</i>	5
1.1.4.1 Organisation des circuits cortico-striés	6
1.1.4.2 Organisation des circuits cortico striés chez un Parkinsonnien	7
1.1.5 <i>Traitements</i>	7
1.1.5.1 Approche pharmacologique	7
1.1.5.2 Approche chirurgicale.....	8
1.2 RADICAUX LIBRES	9
1.2.1 <i>Définition</i>	9
1.2.2 <i>Recyclage de la DA</i>	10
1.2.3 <i>Mécanismes de protection</i>	11
1.2.4 <i>Stress oxydatif exogènes</i>	12
1.2.4.1 Le MPP+	12
1.2.4.2 Le paraquat	13
1.2.4.3 La roténone	13
1.3 ANTIOXYDANTS	14
1.3.1 <i>Oestrogènes</i>	14
1.3.2 <i>Phytoestrogènes</i>	16
1.3 OBJECTIFS.....	18
CHAPITRE II : MÉTHODOLOGIE ET ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	19
2.1 MÉTHODOLOGIE	19
2.1.1 <i>Culture cellulaire</i>	19
2.1.2 <i>Facteur de croissance de nerf (NGF)</i>	20
2.1.3 <i>Cytotoxicité</i>	20

2.1.4 <i>Électrophorèse et immunobuvardage</i>	21
2.2 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE.....	22
2.3 CONTRIBUTION À L'ARTICLE.....	23
2.4 ARTICLE SOUMIS À « ENDOCRINE » ÉDITION SPÉCIALE « ESTROGENS AND BRAIN »	24
ABSTRACT	25
INTRODUCTION.....	26
MATERIALS AND METHODS	27
<i>Cell Culture and Treatments</i>	28
<i>Cytotoxicity and metabolic activity</i>	28
<i>Electrophoresis and immunoblot analysis</i>	29
<i>Data analysis and statistics</i>	29
RESULTS.....	30
<i>MPP+ -induced cytotoxicity</i>	30
<i>Effect of E2, phytoestrogens and Gingko biloba extracts against MPP+ -induced cytotoxicity</i>	30
<i>Effect of E2, phytoestrogens and Gingko biloba extracts on ER b and DAT protein expression</i> ...	31
DISCUSSION	32
LEGENDS.....	35
REFERENCES	43
CHAPITRE III : RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES.....	47
3.1 DOSE-RÉPONSE DU PQ SUR LES CELLULES PC12 DIFFÉRENCIÉES	47
3.2 DIHYDRORHODAMINE 123	48
3.2.1 <i>Protocole de la dihydrorhodamine 123</i>	48
3.2.2 <i>Résultats</i>	49
CHAPITRE IV : DISCUSSION ET CONCLUSION	51
4.1 DISCUSSION	51
4.1.1 <i>Réponses aux objectifs</i>	51
4.1.2 <i>Nouvelles perspectives de recherche</i>	53
4.1.2.1 Toxine environnementale.....	53
4.1.2.2 Étude <i>in vivo</i>	55
4.1.3 <i>Causes d'erreurs</i>	56
4.2 CONCLUSION.....	57
BIBLIOGRAPHIE	59

TABLE DES FIGURES

Chapitre 1 : Introduction

Figure 1.1 : Biopsie du mésencéphale.....	2
Figure 1.2 : Organisation générale des circuits cortico-striés	6
Figure 1.3 : Organisation générale des circuits cortico-striés parkinsonnien	7
Figure 1.4 : Recyclage de la DA	15
Figure 1.5 : Stucture du MPP+.....	13
Figure 1.6 : Stucture du PQ.....	13
Figure 1.7 : Stucture de la roténone	14
Figure 1.8 : Structure et effet neuroprotecteur du β -estradiol.....	15

Chapitre 2: Méthodologie et article scientifique

Figure 2.1 : Mise en évidence des neurofilaments par la rhodamine.....	19
Figure 2.2 : Réaction du dosage de la LDH	21
<u>Article scientifique:</u>	
Figure 1 : Photomicroscopy of PC12 treated with (A) or without (B) NGF.....	37
Figure 2 : Dose response curves for MPP+ induced toxicity.....	38
Figure 3a: Cytotoxicity in native PC12.....	39
Figure 3b: Cytotoxicity in neuronal PC12	40
Figure 4a: ER β protein expression.....	41
Figure 4b: DAT protein expression.....	42

Chapitre 3: Résultats complémentaires

Figure 3.1: Graphique de la dose/réponse du PQ.....	48
Figure 3.2 : Cellules PC12 différencierées marquées à la dihydrorhodamine	50
Figure 3.3: Graphique de l'analyse d'image de la fluorescence	50

Chapitre IV: Discussion et conclusion

Figure 4.1: Graphique de l'effet de l'atrazine sur les cellules PC12 non différencierées....	54
--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC	:	adénylyl cyclase
Ach	:	acétylcholine
ATP	:	adénosine triphosphate
β E ₂	:	17- β -estradiol
BHE	:	barrière hémato-encéphalique
COMT	:	cathécol-O-méthyl-transférase
DA	:	dopamine
DAT	:	transporteur de la dopamine
ER	:	récepteur oestrogénique
ERE	:	élément de réponse aux oestrogènes
FBS	:	sérum fœtal bovin
GPe	:	globus pallidus externe
GPi	:	globus pallidus interne
GPx	:	gluthation peroxydase
HS	:	sérum de cheval
LDH	:	lactate déshydrogénase
MAO	:	monamine oxydase
MP	:	maladie de Parkinson
MPP ⁺	:	1-Methyl-4 phenylpiridinium iodide
MPTP	:	1-Méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NGF	:	facteur de croissance du nerf
NST	:	noyaux sous-thalamiques
NT	:	neurotransmetteur
POD	:	peroxidase anti-peroxidase
PQ	:	dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride
SCP	:	stimulation cérébrale profonde
SOD	:	superoxyde dismutase
VMAT	:	transporteur des monoamines vésiculaires

CHAPITRE I : INTRODUCTION

1.1 La maladie de Parkinson

1.1.1 Aspects cliniques

Identifiée pour la première fois par le docteur James Parkinson en 1817, la maladie du même nom atteint plus d'une personne de 80 ans et plus sur mille dans le monde. De plus forte prévalence chez l'homme (2) que chez la femme (1), elle affecte le système moteur en y détruisant les neurones dopaminergiques de la *pars compacta* de la substance noire mésencéphalique [1]. C'est seulement lorsque entre 70% et 80% des neurones sont morts qu'il devient possible d'observer les premiers symptômes chez les patients atteints et par le fait même d'identifier la maladie. Une fois l'identification faite, le pronostic est mauvais : perte totale d'autonomie dans les 10 ans qui suivent les premiers symptômes [2]. Ce n'est qu'après une analyse *post mortem* que le diagnostic exact peut être confirmé. La biopsie révèle une dépigmentation et une hypertrophie bilatérale et symétrique de la *pars compacta* (Figure 1.1). Cette hypertrophie s'explique par la présence d'astrocytes et de microglies. La présence d'inclusions éosinophiles intracytoplasmiques est aussi observée. Ce sont les corps de Lewy. Ils sont formés de neurofilaments, d'un mélange de granules et de vésicules, et de diverses protéases. La présence de ces protéases s'explique par la fonction normale des corps de Lewy : ils éliminent les déchets et résidus cellulaires. Toutefois, l'accumulation, suite à un stress oxydatif, de trop grandes quantités de neurofilaments à l'intérieur de ces inclusions empêcherait leur bon fonctionnement. Selon cette hypothèse, les corps de Lewy nuieraient aux fonctions exocytaires des neurones et pourraient même mener à la mort cellulaire. Leur présence est aussi observée dans 20% des cas de la maladie d'Alzheimer [3].

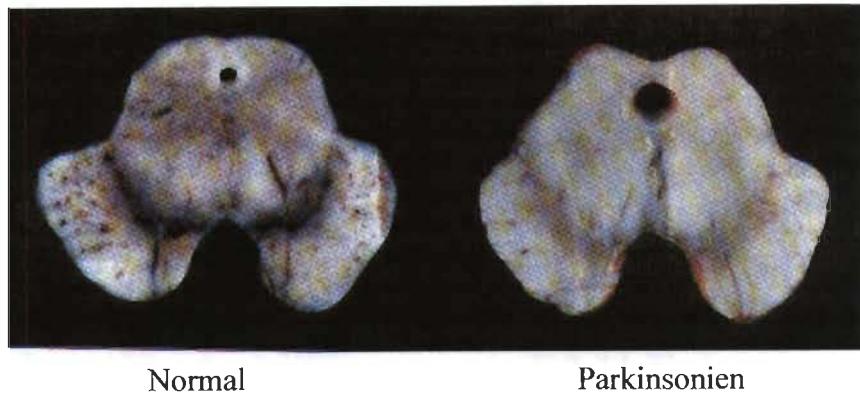


FIGURE 1.1: Comparaison d'un mésencéphale sain (droit) où la substance noire occupe une place importante comparativement à celle du mésencéphale d'un parkinsonien (gauche) où il y a une dépigmentation considérable. Cette même coupe révèle aussi une hypertrophie de la pars compacta (communication privée).

1.1.2 Étiologie

L'observation histo-pathologique permet l'identification de la MP avec certitude sans en révéler la cause. Bien que plusieurs hypothèses existent, l'étiologie de cette neurodégénérescence reste encore inconnue. Une toxine environnementale pourrait très bien être responsable de la mort d'une région aussi spécifique que la substance noire. C'est d'ailleurs ce qu'affirment diverses études en reliant la maladie à de fortes expositions à des insecticides et/ou pesticides [4]. Fait intéressant, les formes idiopathiques de la MP sont retrouvées dans la plupart des cas en milieu rural d'où l'implication possible des pesticides dans la genèse de cette maladie [5]. Certaines formes précoces et familiales de la maladie suggèreraient quant à elles une transmission génétique. En effet, les statistiques révèlent que le risque de développer la MP est cinq fois plus élevé chez une personne dont un parent est atteint par cette neurodégénérescence. Le « Parkin gene », une délétion de 12 exons sur le chromosome 6, serait responsable de 25% des formes précoces [6]. Malheureusement, les causes de

cette délétion sont toujours inconnues. Une substitution d'une paire de bases sur le gène de l' α -synucléine localisé sur le chromosome 4q21-q32 pourrait être aussi impliquée dans les formes génétiques de la maladie. Bien que la fonction de ce gène reste inconnue, il est possible que la protéine mutante qu'il transcrive s'agglutine dans les terminaisons nerveuses, menant à la mort cellulaire.

Certains métaux, plomb, mercure et manganèse, ont été rapporté comme facteur de risque pour la MP. En effet, des expositions aiguës à ces métaux peuvent reproduire les symptômes classiques de la maladie [7]. Par ailleurs, contrairement à beaucoup d'autres pathologies, le tabagisme semble avoir un effet protecteur contre la MP. Les travaux de Prasad ont démontré que la nicotine ralentissait la diminution des récepteurs dopaminergiques et le recaptage de la DA par le DAT, normalement observé chez les patients [8].

1.1.3 Neurophysiologie

Dans un cerveau sain, le rôle de la dopamine (DA), au niveau de la substance noire, est de contrôler et de filtrer l'information provenant du cortex moteur jusqu'à l'exécution d'un mouvement. La DA orchestre donc l'initiation et l'association de divers mouvements. Elle est synthétisée à l'intérieur des neurones dopaminergiques à partir de la tyrosine. Cet acide aminé non essentiel est d'abord transformé en L-dopa par la tyrosine hydroxylase, puis en DA via la dopa décarboxylase. Une fois synthétisée, la DA est stockée dans des vésicules par le transporteur des monoamines vésiculaires (VMAT). La dépolarisation du neurone dopaminergique entraîne le largage des vésicules et de leur contenu dans la fente synaptique. La DA peut alors se lier à un récepteur.

1.1.3.1 Récepteurs dopaminergiques

Il existe cinq classes de récepteurs dopaminergiques (D_1 à D_5), lesquels sont divisés en deux sous-classes; les récepteurs de type D_1 (D_1 -like) comprenant D_1 et D_5 , et les récepteurs de type D_2 (D_2 -like) comprenant D_2 , D_3 et D_4 . Ces cinq récepteurs, bien que différents, sont tous formés d'une seule sous-unité alpha et de sept domaines transmembranaires, liées à une protéine G à l'extrémité C-terminale intracellulaire. La protéine G est couplée à un adénylate cyclase, une enzyme capable de métaboliser l'ATP en AMPc. Ce second messager occupe plusieurs rôles intracellulaires : il active de nombreuses protéines, via la phosphorylation de kinases AMPc-dépendantes. Les récepteurs de type D_1 sont couplés positivement à l'adénylyl cyclase (AC) et permettent l'activation de la voie nigrostriale (voie directe). Les récepteurs de type D_2 sont plutôt couplés négativement à l'AC et inhibent la voie striato pallido nigrique (voie indirecte)[9]. C'est donc l'activité coordonnée de ces deux voies qui permet l'initiation et l'association des mouvements volontaires. Cette fonction au sein des mouvements volontaires se fait principalement par les récepteurs D_1 et D_2 . Les récepteurs D_3 , D_4 et D_5 sont plutôt impliqués dans les émotions et la motivation au niveau du système limbique. Une défaillance du récepteur D_4 peut, par exemple, mener à des troubles d'hyperactivité et de manques d'attention sans toutefois affecter le système moteur [10].

1.1.3.2 Transport de la DA

La DA larguée dans la fente synaptique active un certain nombre de récepteurs. Le surplus de ce neurotransmetteur peut être recapté par le neurone pré-synaptique via des transporteurs transmembranaires. Le transporteur de la DA (DAT) se lie avec beaucoup d'affinité avec la DA et l'achemine à l'intérieur du neurone. Ce transporteur Na^+ -dépendant doit se lier à un ou deux ions Na^+ , à un Cl^- et à une molécule de DA pour être actif. Comme il s'agit d'un transporteur voltage-dépendant, une dépolarisation du neurone l'inhibe alors que l'hyperpolarisation l'active. C'est pour

cette raison que la recapture de la DA ne se fait qu'après une dépolarisation, au moment même où la DA se retrouve dans la fente synaptique. Sachant que le récepteur-D₂ présynaptique a un rôle inhibiteur sur le largage de DA dans la fente synaptique [11], il est normal d'observer une activation accrue du DAT lorsque le récepteur-D₂ est activé, et ce, afin d'internaliser un maximum de DA dans le neurone présynaptique avant de produire une nouvelle dépolarisation.

Suite à sa recapture, la DA est à nouveau stockée sous forme de vésicules grâce au VMAT. Lorsque la DA se retrouve en trop grande quantité soit à l'intérieur du neurone présynaptique ou dans la fente synaptique, deux enzymes peuvent la cataboliser. La monoamine oxydase de type B (MAO-B), située dans la membrane des mitochondries, dégrade la DA intra neuronale, tandis que la cathécol-O-méthyl-transférase (COMT) la dégrade au niveau de la fente synaptique.

1.1.4 Physiopathologie

Suite à la diminution de DA au niveau de la substance noire, diverses défaillances motrices peuvent être observées. Les tremblements involontaires au repos, la lenteur d'initiation des mouvements (bradykinésie) et la raideur des muscles volontaires (hypertonie extrapyramidal) sont des signes évocateurs de cette dégénérescence neuronale [12]. Ce n'est que lorsque deux de ces trois symptômes sont identifiés ou suite à une réponse positive aux traitements dopaminergiques (L-dopa) que le diagnostic de la MP peut être posé. Les principaux symptômes apparaissent suite à l'absence de contrôle de la DA sur le *striatum*. Tel que mentionné précédemment, la DA agit normalement dans la régulation des mouvements volontaires. Une perte de ce neurotransmetteur entraîne une mauvaise régulation.

1.1.4.1 Organisation des circuits cortico-striés

Dans un cerveau sain, les neurones dopaminergiques de la substance noire projettent des afférences au noyau caudé et au putamen, deux régions du striatum. 1) La DA active les neurones de la voie directe via le récepteur D₁. 2) Comme la voie directe est une voie gabaergique (inhibitrice), l'activation de D₁ mène à l'inhibition des neurones inhibiteurs projetant du globus pallidus interne (GPi) vers le thalamus. 3) L'inhibition sur le thalamus étant levée, il peut émettre un signal activateur vers le cortex moteur. 4) La voie indirecte est inhibée par l'activation du récepteur D₂ par la DA. 5) Le globus pallidus externe (GPe) non-inhibé, inhibe les noyaux sous-thalamiques (NST). 6) Les NST étant inhibé, l'activation du GPi ne se fera pas. Par l'intermédiaire du glutamate (Glu), un neurotransmetteur (NT) excitateur, le thalamus peut alors transmettre un signal activateur vers le cortex.

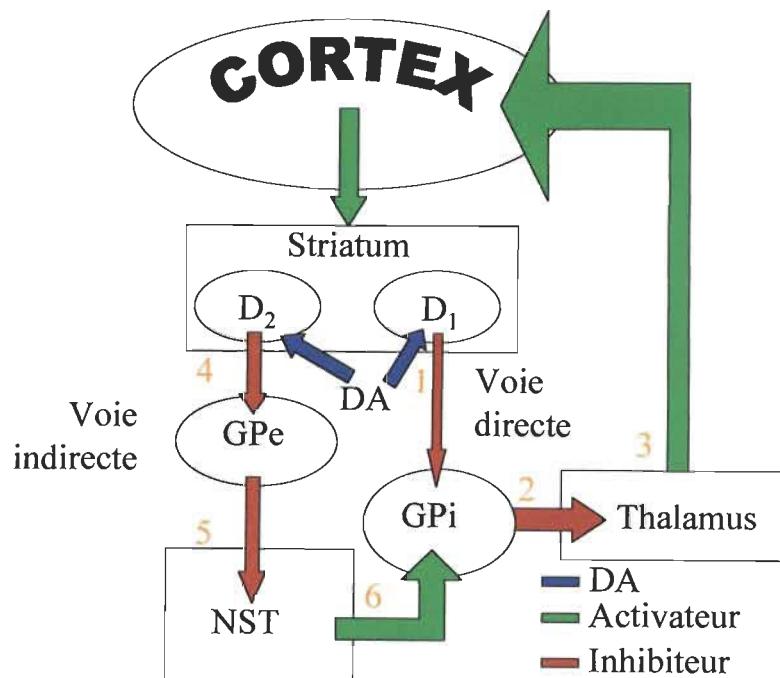


FIGURE 1.2 : Organisation générale des circuits cortico-striés dans un cerveau sain (image adaptée du livre de Purves, Neurosciences, 2000).

1.1.4.2 Organisation des circuits cortico striés chez un Parkinsonien

Dans un cerveau parkinsonien, le signal provenant de la substance noire est considérablement affaibli. 1) Le rôle de la DA sur la voie directe étant d'activer les neurones inhibiteurs projetant vers le GPi, il n'y aura pas de signal vers GPi; 2) donc pas de contrôle sur le thalamus. 3) La voie indirecte normalement inhibée par le récepteur D₂, devient hyperactive. 4) L'inhibition sur les NST étant moindre, il y a une 5) forte activation des neurones du GPi. 6) Ces derniers inhibent les neurones du thalamus ayant pour conséquence d'affecter les mouvements volontaires et de produire les symptômes de bradykinésie et d'hypertonie, par absence de stimulation corticale.

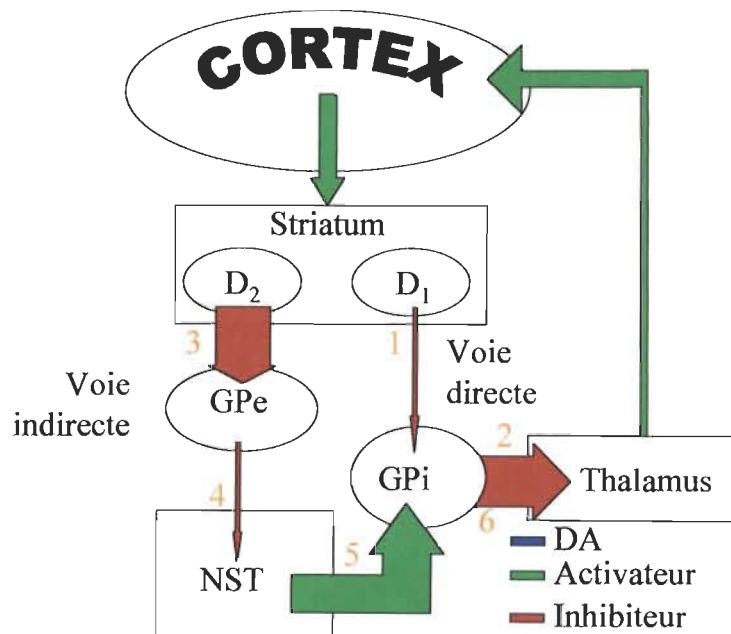


FIGURE 1.3 : Organisation générale des circuits cortico-striés dans un cerveau parkinsonien.
(image adaptée du livre de Purves, Neurosciences, 2000)

1.1.5 Traitements

1.1.5.1 Approche pharmacologique

Comme l'étiologie n'a pas encore été identifiée, il est impossible de guérir efficacement la MP. Il est tout de même possible d'apporter un traitement symptomatique pour un certain temps. Le plus connu de ceux-ci est la levodopa (ou L-

dopa) thérapie. Ce traitement, utilisé depuis le début des années 60, consiste à compenser la perte de DA par l'ajout de son précurseur. En plus d'accroître la quantité de DA disponible, ce médicament est utilisé pour sa facilité à passer la barrière hémato-encéphalique (BHE); ce qui n'est pas le cas de la DA[13, 14]. La faille de ce traitement symptomatique est que, bien qu'il réduise les tremblements, la bradykinésie et l'hypertonie extrapyramidal, il ne ralentit pas la mort des neurones restant de la substance noire. Il semblerait même que l'usage de la levodopa augmenterait la mort des neurones dopaminergiques par une hyperactivation de ces derniers et favoriserait aussi la genèse de radicaux libres (voir 1.2.2 Recyclage de la DA). Ainsi, au bout de quelques années, un tel type de traitement devient inefficace. De plus, la lévodopathérapie occasionne beaucoup d'effets secondaires. Nausées, vomissements, hypotension orthostatique en sont de bons exemples. Pour cette raison, la lévodopathérapie est souvent prescrite en association avec des agonistes dopaminergiques (molécules agissant à même titre que la DA), par exemple la bromocriptine et le pergolide et les anticholinergiques (molécules inhibant l'action de l'Ach), comme la trihexyphénidyl, la proyclidine, l'éthopropazine et la diphenhydramine. Cette nouvelle médication est moins毒ique et plus durable que la levodopathérapie utilisée seule. De plus, les agonistes dopaminergiques ne peuvent s'auto-oxyder et par conséquent, ne génèrent pas de radicaux libres. D'autres traitements pharmacologiques agissent au niveau de l'inhibition de la MAO (sélégiline) ou de la COMT (entacapone et tolcapone), augmentant alors la biodisponibilité de la DA.

1.1.5.2 Approche chirurgicale

Une nouvelle voie pour le traitement de la MP comporte une approche chirurgicale. L'ablation d'un circuit du pallidum (pallidotomie) ou du thalamus (thalamotomie) permet d'augmenter l'inhibition sur le thalamus. En effet, le rôle normal de la DA étant d'inhiber l'afférence des noyaux gris centraux vers le thalamus, la création d'une lésion au niveau du pallidum ou du thalamus (voies activatrices) produira un manque d'activation, tout comme le ferait la DA. Bien qu'à ce jour, de telles chirurgies aient donné de bons résultats chez des individus hautement atteints par

la démence, la possibilité de futurs effets secondaires n'est pas à négliger. La stimulation cérébrale profonde (SCP) peut être une autre chirurgie envisageable dans le traitement symptomatique de la MP. L'implantation d'une électrode de stimulation au niveau du NST permet d'atténuer les tremblements au repos et ce, en causant très peu d'effets secondaires[15]. Récemment, une nouvelle approche thérapeutique a été mise au point afin de régénérer les tissus détruits par la maladie. L'implantation de cellules fœtales sécrétant de la DA permettrait de reconstruire de façon permanente la substance noire et de redonner ainsi un contrôle complet sur la voie motrice. Bien que cette intervention soit encore au stade expérimental, elle risque de changer positivement le sort des Parkinsoniens. Cependant, du point de vue éthique une telle transplantation peut semer la controverse. Comme le taux de survie des cellules souches n'est que de 5 à 20%, il faut beaucoup de fœtus humains pour pouvoir guérir un Parkinsonien. Pour pallier cette problématique, des recherches ont lieu afin de substituer les cellules humaines par des cellules de porc [16].

1.2 Radicaux libres

1.2.1 Définition

Depuis déjà quelques années, l'implication des radicaux libres est fortement liée à certaines dégénérescences neuronales dont la MP, la maladie d'Alzheimer et la sclérose latérale amyotrophique [17]. Identifiés pour la première fois par Gomberg, les radicaux libres sont des molécules électrochimiquement instables dû à un ou des électrons non-pariés [18]. Possédant un temps de demi-vie très court (variable selon le type de radical), ces molécules sont hautement réactives. Le simple fait de vivre dans une atmosphère riche en oxygène (O_2) favorise la formation de ces radicaux. En effet, la respiration cellulaire au niveau mitochondrial génère de grande quantité de radicaux superoxydes ($O_2\cdot^-$). Cette production de radicaux peut d'autant plus être facilitée par un métal de transition. Le fer, normalement lié à la transferrine, peut se retrouver sous forme libre et agir comme accepteur/donneur d'électron. Le fer (Fe^{3+}) délaisse un

électron à l'oxygène pour former l'ion ferreux (Fe^{2+}) et un radical superoxyde. La ferritine, protéine capable de lier le fer et de le rendre inactif, peut donc agir comme antioxydant.

1.2.2 Recyclage de la DA

La production de radicaux libres peut aussi se faire par l'auto-oxydation de certaines molécules. La dégradation normale de la DA entraîne la formation de radicaux superoxydes et de radical hydroxyle ($\text{OH}\bullet$), selon la réaction de Fenclon [18, 19]:

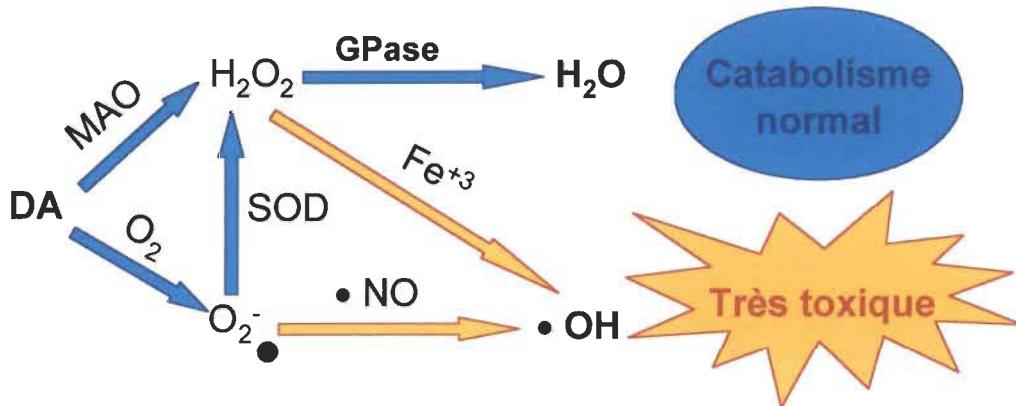


FIGURE 1.4: Recyclage de la DA : La DA est normalement dégradée via la MAO ou via son oxydation directe menant à la formation de $\text{O}_2\bullet^-$. Le $\text{O}_2\bullet^-$ est vite transformé par la superoxyde dismutase (SOD) en H_2O_2 puis en H_2O . Cependant, chez les personnes atteintes de la MP, la SOD est présente en moins grande quantité et la quantité de fer libre est augmentée, favorisant ainsi la formation de radicaux libres (Jenner, P. 1998).

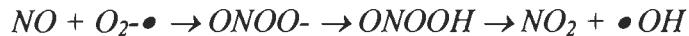
Sachant ceci, il est possible de s'interroger sur l'efficacité réelle de la levodopathérapie. En effet, puisque cette thérapie consiste à produire plus de DA intracellulaire en y ajoutant son précurseur, se pourrait-il que la genèse de radicaux libres soit ainsi favorisée?

Une fois formés, ces radicaux sont hautement réactifs et tentent de se stabiliser en délaissant leurs électrons non-pairés. Captés par des acides aminés, des

phospholipides et/ou des acides nucléiques, les radicaux libres affectent la structure de leur nouvelle cible. L'oxydation de ces composantes altère le bon fonctionnement de la molécule touchée. Du point de vue structurel, les protéines, lipides membranaires et/ou l'ADN ainsi oxydés se fragmentent et forment des agrégats non-fonctionnels et même nuisibles à la cellule. Le désordre qui en résulte mène à la destruction complète de la cellule par des facteurs apoptotiques. L'effet des radicaux libres est d'autant plus dévastateur lorsque les cellules touchées sont des neurones où la régénérescence est quasi inexistante.

1.2.3 Mécanismes de protection

La figure précédente (fig. :1.4) montre aussi la possibilité de former le radical hydroxyle à partir du radical superoxyde par l'intermédiaire d'oxyde nitrique (NO) endogène selon la réaction :



Comme le radical superoxyde est le plus toxique des radicaux libres, et qui possède le temps de demi-vie le plus court, il devient primordial pour la survie cellulaire de limiter sa production. Heureusement, les cellules possèdent des mécanismes enzymatiques capables de réduire la concentration de radicaux libres. La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme qui catalyse le radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Elle fonctionne efficacement tant que le taux de radicaux n'est pas trop grand. Toutefois, une hyperactivité peut devenir tout autant problématique. En effet, comme la SOD catalyse le radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène, une hyperactivité mènerait à de forte concentration de peroxyde d'hydrogène, et ultérieurement à de fortes concentrations de radical hydroxyle. À des concentrations normales de radicaux, c'est l'action coordonnée de la SOD avec la glutathion peroxydase (GPx) et/ou de la catalase qui permet la neutralisation des radicaux libres en H₂O selon la réaction :



Cependant, lorsque la concentration de radicaux libres devient trop importante, la cellule ne peut prendre le dessus et meurt. C'est ce qui se produit dans la MP où, en plus d'avoir beaucoup de radicaux, la concentration de SOD est diminuée tandis que la concentration de fer libre est augmentée [17, 19].

1.2.4 Stress oxydatifs exogènes

Afin de reproduire les conditions de stress oxydatif du cerveau d'un Parkinsonien, l'utilisation de stress oxydatif exogène est envisageable. La littérature rapporte qu'au moins trois toxines peuvent reproduire ces conditions; le 1-methyl-4 phenylpiridinium iodide (MPP+), le 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride (PQ) et la roténone [20].

1.2.4.1 Le MPP+

Découvert au début des années 80 comme molécule contaminante de l'héroïne, le MPP+ est le métabolite actif du 1-Méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Après avoir franchi la barrière hémato-encéphalique, la MAO-B transforme le MPTP en MPP+. Il peut alors pénétrer dans le neurone dopaminergique grâce au DAT [21, 22]. Se liant à la neuromélanine, il exerce son action毒ique en inhibant la NADH déhydrogénase du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale[23, 24]. Ce complexe est normalement responsable du transfert des électrons vers la matrice mitochondriale afin de produire l'adénosine triphosphate (ATP). Son inhibition bloque donc la synthèse d'ATP [24]. Ce déficit d'ATP peut aussi être observé comme une carence en O₂, entraînant la cellule dans un état d'hypoxie. Pour compenser ce manque d'O₂, la cellule fabrique du O₂• [25, 26]. Bien qu'elle reproduise les conditions symptomatiques des parkinsoniens chez les modèles animaux (principalement les singes traités au MPP+)[27], cette toxine n'a jamais été isolée dans un cerveau parkinsonien. De plus, l'examen neuropathologique des singes MPP+ révèle l'absence de corps de Lewys et une atteinte sélective de la substance noire épargnant le locus coeruleus comparativement aux observations faites sur les cerveaux parkinsoniens.

humains. Elle ne serait donc pas impliquée dans les formes idiopathiques de la maladie. Toutefois, la tetrahydroisoquinoline, un analogue structurel au MPP+, aurait été isolée du cerveau[28]. Cette molécule reproduit les symptômes classiques de la MP. Elle agirait au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire [29]. Malheureusement, son utilisation dans un contexte *in vitro* est plutôt difficile; elle est beaucoup trop toxique pour les cellules en culture.

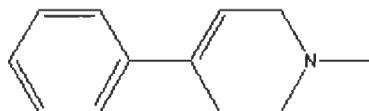


FIGURE 1.5 : Structure du MPP+
(<http://chemfinder.cambridgesoft.com/>)

1.2.4.2 Le paraquat

Le PQ est utilisé comme herbicide non spécifique et conduit à l'épuisement du NADPH. Il génère directement des radicaux libres et cause la peroxydation lipidique dans la cellule[30]. Le choix premier de cet agent毒ique est dû à son analogie structurel avec le MPP+. Contrairement à ce dernier, le PQ est utilisé en agriculture et peut se retrouver dans l'alimentation. Son implication dans la genèse de la MP est donc plus plausible. Sa dose létale est de 35 mg/kg; ainsi, pour une personne d'un poids de 70 kg, il faudrait 2,45 g pour qu'elle meure. L'utilisation du PQ en agriculture est donc remise en question. De plus, il reste stable dans l'eau pour une durée d'environ 23 semaines, ce qui permet la contamination des eaux souterraines, puis ultérieurement de l'homme.

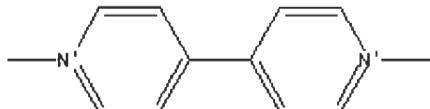


FIGURE 1.6 : Structure du paraquat
(<http://chemfinder.cambridgesoft.com/>)

1.2.4.3 La roténone

La roténone est une autre molécule toxique pour les neurones dopaminergiques. De structure différente au deux précédentes, elle agit aussi au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale [31]. Elle est encore à l'étude pour de futurs tests tant *in vivo* que *in vitro* [32, 33]. De nos jours, elle est encore utilisée comme

insecticide végétal naturel. Elle est présente dans plus de 68 espèces de légumineuses et plantes tropicales, et bien qu'efficace contre les insectes, sa dose létale est très élevée pour les animaux de sang chaud, à l'exception du porc et des poissons.

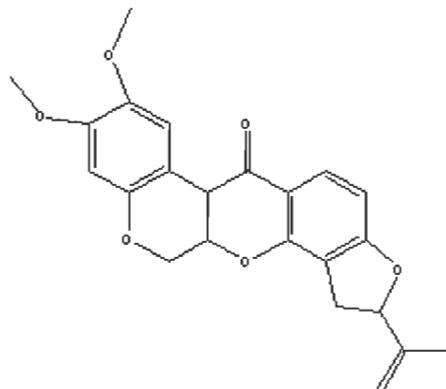


FIGURE 1.7 : Structure de la roténone
(<http://chemfinder.cambridgesoft.com/>)

1.3 Antioxydants

1.3.1 Oestrogènes

L'inefficacité des traitements pour combattre la MP a poussé la recherche vers d'autres alternatives. En effet, l'utilisation préventive d'antioxydants semblerait diminuer les risques de développer des maladies dégénératives. Une étude démontre que les femmes ménopausées ayant subit une hormonothérapie oestrogénique avaient moins de chances de développer une maladie neurodégénérative que celles qui ne prenaient pas d'oestrogènes [34, 35]. Depuis, l'utilisation de l'estradiol (E_2) comme antioxydant a été prouvée [36, 37]. Les oestrogènes se retrouvent sous trois formes endogènes, soit le β -estradiol (βE_2), l'estrone et l'estriol [38]. Ces différentes hormones activent les mêmes récepteurs, l' α ER (~67kDa) et le β ER (~54kDa). Génétiquement, les récepteurs œstrogéniques présentent 95% d'analogie et ne diffèrent principalement que par leur domaine de liaison du ligand. La localisation de ces récepteurs diffère aussi dans l'organisme. L' α ER se retrouve principalement au niveau

des organes sexuels féminins (vagin, utérus) tandis que le β ER se retrouve principalement au niveau des glandes sexuelles (ovaires, prostate et testicules) et est largement répandu dans le système nerveux central [39].

L' E_2 , en se liant à son récepteur cytoplasmique forme un dimère capable de se lier à l'ADN sur l'élément de réponse aux oestrogènes (ERE). La transcription de l'ADN mène à la synthèse de facteurs anti-apoptotiques (BCL-2, par exemple), de protéines d'elongation axonale (neurofilaments) et de récepteurs oestrogéniques [40]. Cette voie de transcription est appelée : « réponse tardive ». Une réponse directe (sans transcription d'ADN) est aussi possible via un ER transmembranaire, bien que l'existence d'un tel récepteur reste encore controversée. Par ailleurs, l' E_2 agit comme capteur direct de radicaux libres, sans l'intervention d'aucun récepteur. Cette propriété lui viendrait de la possibilité de lier un radical libre par son groupement hydroxyle (OH) du cycle A (Figure 1.7)[37]. De plus, des études antérieures ont démontré que l' E_2 maintenait l'intégrité des neurones dopaminergiques et pourrait donc servir dans le traitement de la MP [40-43]. Cependant, l'utilisation des oestrogènes comporte plusieurs effets hormonaux indésirables, tel le développement du cancer des cellules glandulaires du sein [44]. L' E_2 est une hormone qui possède plusieurs récepteurs dans tout l'organisme et qui a un fort pouvoir mitotique.

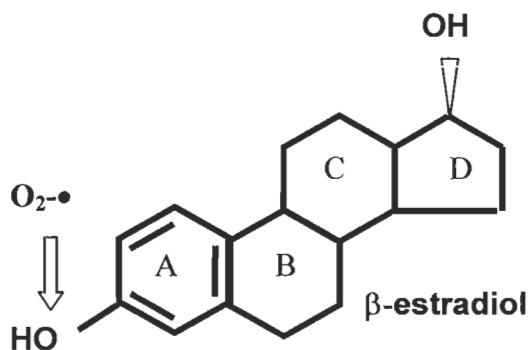


FIGURE 1.7 : Structure et effet neuroprotecteur du β -estradiol : il est capable de capter un radical libre et de le stabiliser (<http://chemfinder.cambridgesoft.com/>)

1.3.2 Phytoestrogènes

C'est dans le but de diminuer le pouvoir hormonal des oestrogènes que l'utilisation des phytoestrogènes pourrait s'avérer des plus intéressantes dans la prévention des maladies neurodégénératives [45, 46]. Ces molécules de structures similaires aux oestrogènes ne produisent pas une réponse hormonale aussi puissante mais peuvent tout de même se lier au α ER et β ER avec une faible affinité[47]. Fait intéressant à propos de ces phytoestrogènes, ce sont des molécules naturelles retrouvées dans une grande variété de végétaux comestibles. En effet, le soya et ses dérivés (le tofu, par exemple), le trèfle, la luzerne et les pois verts sont des exemples d'aliments riches en phytoestrogènes. Les vitamines antioxydantes C et E, le coumestrol et à la genistéine sont tous des exemples de molécules favorisant une meilleure santé [48, 49].

Parmi ceux-ci, notre intérêt s'est porté sur la quercitine et le kaempférol, tous deux présents dans les extraits de feuille de Ginkgo biloba. Cet arbre d'origine orientale a été reconnu comme un arbre sacré pour ses vertus thérapeutiques. Tout comme l' E_2 , en plus de capter les radicaux libres [50-52], les extraits de Ginkgo biloba moduleraient aussi l'expression de certains gènes [53]. Leur efficacité a déjà été mise à l'épreuve dans le traitement préventif d'autres maladies neurodégénératives [44, 45, 54]. En effet, les extraits de Ginkgo biloba semblent protéger les neurones contre les plaques β -amyloïdes présentes dans la maladie d'Alzheimer [55]. Un de ces extraits, le EGb 761 est composé de 5-7% de terpènes (ginkgobilides et bilobalides) et de 22-27% de flavonoïdes (quercitine, resvératrol et l'isorhamnetin) [50, 55, 56]. Pour ce qui concerne l'autre extrait de Ginkgo biloba, le CP 202, il n'est composé que par des flavonoïdes [57]. L'affinité de la quercitine et du resvératrol pour les récepteurs oestrogéniques a d'ailleurs été démontrée [47]. Cette affinité est moindre que celle de l' E_2 pour son récepteur. Plusieurs recherches ont mis en évidence que les flavonoïdes pourraient jouer une fonction d'agoniste et d'antagoniste partiel [46].

Ils n'auraient donc pas assez d'affinité pour déclencher une réponse physiologique à tout coup, et bloqueraient ainsi les récepteurs pour l'E₂.

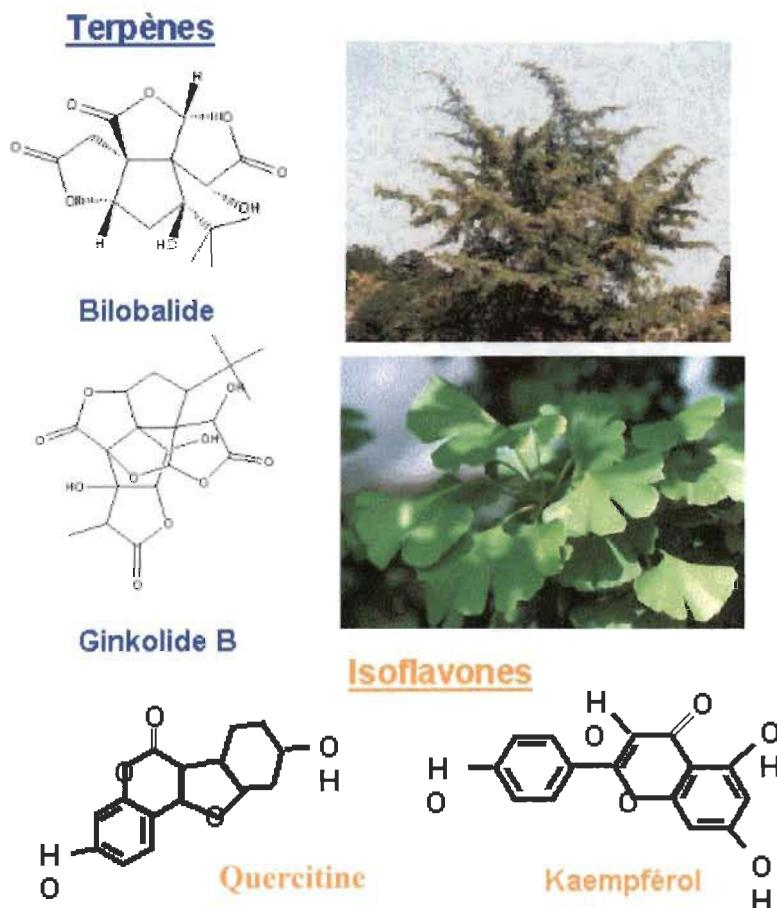


FIGURE 1.8: Phytoestrogènes et Ginkgo biloba : Les extrait Egb 761 sont composés d'isoflavones et de terpènes alors que les extraits CP202 ne contiennent que les isoflavones. Les isoflavones sont des stéroïdes de structure analogue à l'E₂. (Molécules tirées de <http://chemfinder.cambridgesoft.com/>; les photos de l'arbre de Ginkgo biloba et des feuilles de Ginkgo biloba proviennent de communication privée)

1.3 Objectifs

Le but premier de ce projet de maîtrise est de trouver un produit qui a les propriétés antioxydantes des oestrogènes mais qui ne comporte pas les effets indésirables de ces hormones.

C'est dans cette optique que l'efficacité de deux extraits de Ginkgo biloba, le EGb 761 et le CP 202, ainsi que leurs composés flavonoïdes purifiés, soit le kaempférol et la quercitine, ont été testés. Pour ce faire, ce projet de maîtrise a été divisé en trois volets : 1) Déterminer l'effet neuroprotecteur des phytoestrogènes sur des cellules ayant subi un stress oxydatif. 2) Contrôler le niveau d'expression de certaines protéines susceptibles de contribuer à l'effet neuroprotecteur. 3) Vérifier le pouvoir des phytoestrogènes à capter directement les radicaux libres.

CHAPITRE II :

MÉTHODOLOGIE ET ARTICLE SCIENTIFIQUE

2.1 Méthodologie

2.1.1 Culture cellulaire

Pour réaliser ces objectifs, nous avons utilisé un modèle cellulaire reproduisant les conditions de la MP. Notre choix s'est arrêté sur les cellules PC12. Cette lignée cellulaire provient de phéochromocytome de la médullosurrénale de rat. Ces cellules sont capables de produire des catécholamines (l'adrénaline, la noradrénaline et la DA) et d'exprimer le DAT et le βER (FIG.1.B, p37), ainsi que des neurofilaments.



FIGURE 2.1 : Mise en évidence des neurofilaments par la rhodamine dans les PC12 différencierées (Photo prise par Mme Sylvie Gélinas)

La culture des PC12 s'est faite selon les protocoles standards et de façon stérile. Les cellules ont été cultivées à une densité de 40 000 cellules/cm² ce qui représente la

densité optimale pour leur développement. Leur culture s'est faite dans un milieu RPMI 1640, sans rouge de phénol pour éviter une interaction avec les pré-traitements oestrogéniques, et en présence de 5% de sérum fœtal bovin (FBS) et de 10% de sérum de cheval (HS). Les cellules sont conservées à 37°C avec 5% de CO₂. Le milieu devait être remplacé à tous les trois jours par du milieu frais. 48 heures avant le début des tests comportant un traitement avec des oestrogènes ou des phytoestrogènes, le milieu est remplacé par un milieu où les sérum sont déprivés de stéroïdes pour éviter que les résultats soient biaisés par ces stéroïdes. Des prétraitements de 24 heures sont ensuite nécessaires pour vérifier l'effet à moyen/long terme des composés utilisés sur les PC12. Les concentrations de E₂ et des phytoestrogènes (10⁻⁷ mol/ml et 10mg/ml) ont été déterminées par des études préalables de dose/réponse et selon la littérature [58].

2.1.2 Facteur de croissance de nerf (NGF)

Le NGF est un peptide capable de favoriser la régénérescence et la croissance neuronale. Avec un traitement de 50ng/ml de NGF pendant 12 jours, les cellules PC12 sont capables de se différencier en phénotype neuronal. En plus d'avoir l'aspect de neurones, ces cellules expriment plus de DA, de DAT et de βER (FIG.:1.A, p37). Une fois différenciée en phénotype neuronal, les cellules PC12 sont soumises au même traitement que les cellules non-différenciées. La différenciation cellulaire s'effectue avec du milieu RPMI avec 1% de FBS et à une densité de 20 000 cellules/cm².

2.1.3 Cytotoxicité

L'évaluation de la cytotoxicité des agents toxiques (MPP+ et PQ) a été faite grâce au dosage de la LDH. Cette enzyme cytosolique se retrouve dans le milieu de culture après la mort de cellules. En ajoutant le sel de tétrazolium au surnageant, il devient possible de quantifier quantitativement le taux de LDH libéré dans le milieu de

culture. En effet, la LDH présente dans le surnageant produit du NADH + H⁺ qui transforme le sel de tétrazolium (de couleur jaune) en sel de formazan (de couleur rouge) (Figure 2.2). En résumé, plus la LDH est présente dans le milieu plus le surnageant est rougeâtre à cause de la présence de sel de formazan. L'absorbance de la lumière peut être mesurée à une longueur d'onde de 490nm à l'aide d'un spectrophotomètre de plaque. Les données obtenues sont comparées à des valeurs contrôles en absence de toxine (low control) par rapport à des valeurs où les cellules ont toute été tuées par l'ajout du Triton-X (high control), un détergent capable de détruire les membranes cytoplasmiques des cellules. Il devient alors possible d'évaluer l'effet protecteur de l'E₂ et des phytoestrogènes contre les stress oxydatifs exogènes selon l'équation :

$$\% \text{ de mort cellulaire} = \frac{\text{Absorbance (x)} - \text{Absorbance (low control)}}{\text{Absorbance (high control)} - \text{Absorbance (low control)}} * 100$$

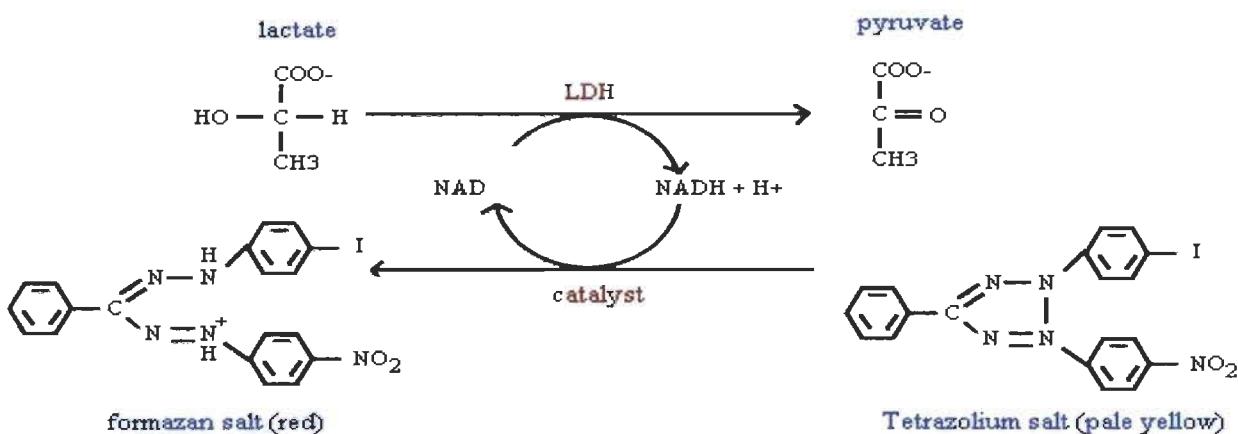


FIGURE 2.2 : Réaction du dosage de la LDH (Image reproduite du livret d'instruction de chez Roche Diagnostics)

2.1.4 Électrophorèse et immunobuvardage

Après avoir traité les cellules avec les toxines et les molécules neuroprotrectrices, l'extraction des protéines peut être faite par le « Tri Reagent ». Le mélange de protéines est ensuite solubilisé pour déterminer leur concentration par

spectrophotométrie avec le Dye-Reagent. Une fois la concentration déterminée, 20 µg de protéines sont mis dans les puits d'un gel de poly-acrylamide contenant 10% de sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE) pour les faire migrer par électrophorèse. Afin de déterminer la quantité d'une protéine en particulier, les protéines sont transférées sur une membrane de nylon, de type PVDF, avec un courant de 180 volts pendant une heure. Une fois le transfert terminé, la membrane est bloquée par une solution de 5% de lait en poudre non gras. Ceci limite les sites de liaisons non spécifiques aux anticorps. Comme nous voulions déterminer le taux d'expression du DAT et du récepteur β ER en présence des phytoestrogènes, les anticorps utilisés étaient spécifiques à ces deux protéines. Après avoir été mis en contact pendant une heure avec la membrane à une concentration de 1 :1000, un anticorps secondaire conjugué à la peroxidase anti-peroxidase (POD) est ajouté à la membrane. Cette enzyme se lie avec une molécule chemiluminescente et révèle la présence des deux protéines. Les protéines peuvent ainsi être révélées sur un film d'autoradiographie. Pour terminer, l'analyse du film avec un système informatique d'analyse d'image permet de quantifier semi-quantitativement les concentrations de chaque protéine selon différentes conditions par rapport à des contrôles.

2.2 Résumé de l'article

L'article soumis à l'édition spéciale «Estrogens and Brain» du journal scientifique «Endocrine» fait mention des différents résultats obtenus en culture cellulaire. Comme il a été mentionné précédemment, l'implication de radicaux libres pourrait avoir un effet important dans la pathogenèse de la MP. Afin de reproduire les conditions de stress oxydatif de la maladie, nous avons utilisé les cellules PC12 non-différenciées et différenciées en phénotype neuronal et les avons soumises au MPP+ afin de générer un stress oxydatif. L'ajout de quercitine, de kaempférol, de Egb 761, de Cp 202 et de β E₂ nous a permis de constater une protection des cellules vis-à-vis du stress oxydatif induit par le MPP+. L'effet neuroprotecteur observé était plus important avec l'utilisation des deux extraits de Ginkgo biloba, tant pour les cellules

différenciées que non-différenciées. Toutefois, la quercitine et le β E₂ sont aussi capables de prévenir l'attaque du MPP+ dans les cellules différenciées. L'analyse par « Western Blot » démontre que l'expression du DAT, contrairement à celle du β ER, peut être modulée par le MPP+. Les extraits de Ginkgo biloba peuvent aussi diminuer le taux d'expression de ces deux protéines dans les cellules différenciées tandis que la quercitine l'augmente.

2.3 Contribution à l'article

L'article scientifique est le résultat de mes travaux personnels de recherche. Je dois remercier Mme Sylvie Gélinas de m'avoir permis d'utiliser ses résultats sur l'effet de la quercitine et du kaempférol sur les cellules PC12 non différenciées et différenciées, ainsi que les résultats de la dose/réponse du MPP+ (Figure 2, p.38). L'élaboration des protocoles expérimentaux a été en partie faite par Mme Gélinas, le Dr Martinoli et moi-même. Je remercie le Dr. Ramassamy pour nous avoir donné les extraits de Ginkgo biloba et aussi tous les autres collaborateurs pour leur aide technique qui a permis l'avancement de mes travaux, bien qu'ils n'aient pas contribué directement aux résultats présentés dans l'article. L'article a été rédigé par le Dr. Martinoli. J'ai contribué à la rédaction des sections matériel & méthodes ainsi qu'aux sections d'introduction et des résultats.

2.4 Article soumis à « Endocrine » édition spéciale « Estrogens and Brain »

**Effect of Estradiol, Phytoestrogens and Ginkgo biloba extracts
against MPP+ -induced oxidative stress.**

Benoît Gagné¹, Sylvie Gélinas^{1,2}, Geneviève Bureau¹, Bruno Lagacé¹, Charles Ramassamy¹, Keith Chiasson¹, Barbara Valastro¹ and Maria-Grazia Martinoli^{1,2}.

1: Department of Biochemistry, Research Group in Neuroscience, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada.

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

Running title: Phytoestrogens and oxidative stress

ABSTRACT

Oxidative stress has been recently considered as a mediator of nerve cell death in several neurodegenerative diseases. We studied the effect of the parkinsonism-inducing toxine, MPP⁺ on several parameters of cell distress using native and neuronal PC12 cells. Then, since estrogens have been reported to prevent neuronal degeneration caused by oxidative damage, we investigated the ability of β -estradiol, two Ginkgo biloba extracts, EGb 761 and Cp 202, as well as two flavonoids, quercetin and kaempferol, to rescue PC12 cells submitted to MPP⁺ -induced oxidative stress. Our results consistently show that both Ginkgo biloba extracts could prevent cellular death in native and neuronal PC12 cells, while in neuronal PC12 cells also quercetin and β -estradiol could reverse MPP⁺ neurotoxic effet. Western blot analysis demonstrated that MPP⁺ injuries might modulate dopamine transporter protein expression but not estrogen receptor β protein expression. EGb 761 and Cp 202 also modulate dopamine transporter and estrogen receptor β protein expression in neuronal cells. By these studies, we outline the importance of testing estrogen-like plant-derived molecules as potent anti-oxidants and study their effect on protein expression.

Key words: oxidative stress, estrogens, phytoestrogens, Ginkgo biloba, dopamine transporter, estrogen receptor, MPP⁺.

INTRODUCTION

Many factors have been implicated in the pathogenesis of neural cell degeneration. It is likely that a cascade of events involving free radicals, mitochondrial dysfunctions, cerebral amyloidosis, genetic and environmental factors contributes to the neurodegenerative process (1-4). The central nervous system is indeed characterized by a high rate of oxidative metabolic activity, thus it may be particularly susceptible to oxidative damage (5).

1-Methyl-4-phenyl-pyridinium (MPP⁺) is the active metabolite of the parkinsonism-inducing toxin 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) which causes dopaminergic cell death through the inhibition of mitochondrial complex I. MPP⁺ is selectively taken up by dopamine neurons via its high affinity dopamine transporter (DAT) (6) and it is reported inducing oxidative stress in the cellular environment by increasing free radicals formation (7, 8). However, the precise mechanism by which MPP⁺ or MPTP kill the cells is still under investigation (9-12).

Phytoestrogens have commanded a great deal of investigations due to their potential for protecting various body systems against free radical attack (see for review 13-15). Yet, very few studies have examined the role of phytoestrogens against oxidative damage induced by the neurotoxin MPP⁺ (16). The standardized Ginkgo biloba extract EGb 761 is composed of 22-27% flavonol glycosides (kaempferol, quercetin, and isorhamnetin), 5-7% terpene lactones (3% bilobalides and 3% ginkgolides) (17-19) while Cp 202 is devoid of terpenes (20). A large body of literature describes Ginkgo biloba extracts as free radical scavengers both in vitro and in vivo (17, 21, 22). They are also reported to prevent apoptosis of neural cells (23-25), protect against β amyloid toxicity (18), help prevent strokes and ischemic attacks (26) and preserve, in part, dopamine (DA) neurons (27-29). However, their possible role as modulators of hormonal receptors is much less studied. The phytoestrogens quercetin

and kaempferol are the major flavonoid components of EGb 761 and CP 202 and are also known binding the estrogen receptor β (ER β) with low affinity (30).

They are reported to act as potent anti-oxidants but whether their anti-oxidant effect is mediated thought a nuclear estrogen receptor (ER) or by a direct mechanism is still matter of debate (16, 31).

In this study, we investigated the role of oxidative stress on native (undifferentiated) and neuronal (NGF-differentiated) PC12 cells. We also compared Ginkgo biloba extracts to their flavonoid counterparts and to β estradiol (E2) for the ability to revert oxidative damages. Our results enlighten the involvement of E2, Ginkgo biloba extracts and quercetin to protect against oxidative stress in neuronal cells. Moreover, our data also show that treatments with quercetin, EGb 761 or Cp 202 modulate ER β protein expression as well as DAT protein expression and thus point out the importance of studying the role of plant-derived molecules at transcriptional level.

MATERIALS AND METHODS

Culture medium RPMI 1640, fetal calf and horse serum were obtained from Life Technologies (Ont., Canada). Penicillin, streptomycin and nerve growth factor 7S (NGF), were purchased from Sigma Chemicals (Ont., Canada). Cytotoxicity detection kit [lactate dehydrogenase (LDH)] and POD-conjugated secondary antibody were purchased from Roche Molecular Biochemicals (Quebec, Canada). Polyclonal anti-dopamine transporter (DAT) antibody (No. AB1591P) was purchased from Chemicon International (Temecula, CA), whereas polyclonal anti-estrogen receptor beta (ER β) antibody (No. PC168) was bought from Calbiochem-Novabiochem International (San Diego, U.S.A.). Kaempferol, quercetin, E2, MPP⁺ and XTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetra-zolium-5-carboxyanilide), were from Sigma Chemicals (Ont., Canada). Gingko biloba extract EGb761 (Tanakan, Beaufour-IPSEN laboratories, Paris, France) contains 24% flavonoid glycosides and 6% terpenoids while Cp 202 corresponds to the EGb 761 extract devoid of terpenic substances (20).

Cell Culture and Treatments

PC12 cells were obtained from ATCC (Rockville, U.S.A.) and were grown in RPMI 1640 medium, without phenol red, supplemented with 5% foetal calf serum and 10% horse serum. Cells were cultured on Primaria 96-well plates (BD Falcon, Ont., Canada) for LDH and XTT experiments and on 6-well plates for immunoblot analysis. They were fed with fresh medium every 3 days and maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. PC12 neuronal phenotype (Fig. 1) was induced by adding NGF (50 ng/ml) in fresh RPMI containing 1% fetal bovine charcoal-treated serum to remove steroids from medium (stripped serum) (32). After 12 days, cells were fed with fresh medium and pre-treated for 24 hours with 10-7 M E2, kaempferol, quercetin, 10mg/ml EGb 761 or 10mg/ml CP 202 (16, 33). All of these experimental conditions were selected after time course (data not shown) and dose response studies (Fig. 2). After pre-treatment, 5 mM MPP⁺ were added and cells were incubated for 24 hours (16, 34, 35). Cell density was constant at 20 000 cells/cm². The same experimental conditions were used for native PC12 cells without adding NGF. All controls were treated with vehicle alone, i.e. RPMI medium with stripped serum.

Cytotoxicity and metabolic activity

MPP⁺ cytotoxicity was evaluated by colorimetric assay for the quantification of cell death based on the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity released from the cytosol of damaged cells into supernatant, as already described (16). Briefly, media were collected, centrifuged and 100 ml of cell-free supernatant were used to determine LDH activity by measuring the absorbance at a wavelength of 490 nm on an ELISA plate reader (Bio-Rad, model 450). Total cellular LDH was determined by lysing cells with 1% Triton X-100. In parallel to cytotoxicity evaluation, we assessed cellular proliferation by measuring total metabolic activity using the XTT test (36).

XTT is a soluble tetrazolium salt that is converted in formazan by cell dehydrogenases. Absorbance was measured directly in 96 well plates at 490 nm (with a reference wavelength of 690 nm) 20 hrs after the addition of XTT to cell culture medium at a concentration of 1 mg/ml in presence of 1% phenazine methosulfate as a coupling agent.

Electrophoresis and immunoblot analysis

Total cellular protein was extracted by TRI Reagent (Sigma, Ont., Canada). Proteins were solubilized in 50 ml of 100 mM Phosphate-buffer saline (pH 8) and their concentrations were determined by a protein assay (Bio-Rad, Ont., Canada). Equal amounts of protein were loaded onto a 10% SDS gel. After electrophoretic separation, polyacrylamide gels were transferred onto PVDF membranes (0.2 mm pore size, Bio-Rad) at 180 V for 1 hours. Then membranes were blocked with 5% non-fat powder milk for 1 hour. Immunoblotting was probed with the primary antibody for 1 hour. Dilution of anti-DAT and anti-ER β was 1:1000. POD-conjugated secondary antibody was added for 30 min. Immunoblots were developed with an enhanced chemiluminescence method (Roche, Qc., Canada).

Data analysis and statistics

Autoradiograms were digitized transferred onto a personal computer and analyzed with the EDAS image analysis system (Kodak, Rochester, NY). Statistical significance was assessed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparison test. Data are expressed as mean \pm S.E.M.

RESULTS

MPP⁺ -induced cytotoxicity.

Firstly we carried out dose response and kinetic studies of MPP⁺ cytotoxicity in both native and neuronal PC12. Cytotoxicity was measured by using LDH colorimetric analysis and revealed a significant cell death following exposure to 5 mM MPP⁺ for 24 h in both native and neuronal cells (Fig. 2).

Effect of E2, phytoestrogens and Gingko biloba extracts against MPP⁺ –induced cytotoxicity.

The ability of E2, the phytoestrogens quercetin and kaempferol as well as the two Gingko biloba extracts, EGb 761 and Cp 202, to reverse MPP⁺ -induced toxicity was investigated using LDH analysis. A 24-h -pretreatment of native PC12 cells with 10–7 M E2, quercetin or kaempferol did not reduce MPP⁺ -induced toxicity in native PC12 (Fig. 3A). While, 10 mg EGb 761 or 10 mg Cp 202 could significantly reduce MPP⁺ -induced cellular death by 40% and 57%, respectively (Fig. 3A). Notably, treatment of neuronal PC12 with 10–7 M E2, quercetin, EGb 761, Cp 202 but not kaempferol, could indeed reverse neuronal death of 79%, 64%, 84% and 87%, respectively (Fig. 3B). When 10–7 M E2, Ginkgo biloba extracts, quercetin or kaempferol were used alone for 24 hours in native and neuronal PC12, we did not observe any change of LDH activity compared to control cells treated with vehicle, i.e. RPMI with stripped serum (data not shown). Moreover, metabolic activity was reduced for native and neuronal PC12 cells treated with MPP⁺ alone (data not shown), while cells treated with E2, phytoestrogens or Ginkgo biloba extracts prior to MPP⁺ administration have a higher metabolic activity, as already demonstrated (16). Treatments for 24 hours with the same substances without MPP⁺ did not induced any statistical significant differences in cellular proliferation.

Effect of E2, phytoestrogens and Ginkgo biloba extracts on ER b and DAT protein expression.

To determine whether these compounds may actually modulate ER b and/or DAT protein expression in neuronal PC12, we performed western blot analysis as already described (16). Figure 4A shows that MPP⁺ treatment does not change the relative levels of ER β protein expression, yet decreases DAT protein expression (Fig. 4B). When we administered E2, quercetin or kaempferol prior to oxidation, we did not detect any change in ER β expression; however, EGb 761 and Cp 202 could modulate ER β by decreasing its relative levels (Fig. 4A). In particular, administration of Cp 202 prior to MPP⁺ significantly decrease ER β protein expression while treatment with EGb 761 prior to MPP⁺ shows a ER β -protein reduction which is actually not statistically significant (Fig. 4A). E2 or quercetin, when used alone, increased ER β expression in our cellular paradigm, while kaempferol or Cp 202 did not modulate ER β and EGb 761 reduce it.

Fig. 4B shows that MPP⁺ is responsible for an important decrease of DAT protein levels. Treatments with kaempferol or quercetin prior to oxidative stress revert DAT expression to almost control levels, while the two Gingko biloba extracts reduce it further. Besides, kaempferol, Cp 202 or EGb 761 decrease DAT protein expression when used alone, suggesting that they could prevent or otherwise hamper MPP⁺ toxic effects by acting on DAT transcription. Administration of E2 or quercetin prior to MPP⁺ induce an important increase of DAT expression (Fig. 4B).

DISCUSSION

This study presents results showing that *Ginkgo biloba* extracts are powerful molecules to revert free radical damage in both native and neuronal PC12. Our data also show that EGb 761 and Cp 202 regulate ER β and DAT protein expression.

PC12 cells are well-known catecholamine secreting cells which, following NGF treatment, differentiate in a neuronal-like phenotype that secrets high level of DA, expressing neurofilaments and DAT proteins (37, 38). In addition, PC12 cells produce detectable levels of ER β (39) and they have already successfully been used to study oxidative stress (16, 19, 24). Within our experiments, exposure of native or neuronal PC12 cells to the neurotoxin MPP⁺ resulted in a concentration-dependent increase of cell death, with approximately 30% cell death with 5mM MPP⁺ over a 24 h time period. This relatively high dose of MPP⁺ was required in our cellular system as well as in others (16, 34, 35) to reach significant cellular death over a short time period.

Recent clinical data have reported the benefits of estrogen replacement therapy (ERT) on various central nervous system functions. For example, estrogens may play an important role in the etiology of Alzheimer's disease by preventing amyloid plaque formation, oxidative stress and decline of the cholinergic system (see for a review 40-43). In addition, estrogens have been shown to maintain the integrity of dopamine neurons and thus might be a potential therapy for Parkinson's disease (16, 44-46) and be beneficial in preserving cognitive function in both human (47) and animals (48). On the other hand, ERT may be detrimental on other target tissues. There is in fact a serious concern that ERT may increase the incidence of breast cancer (reviewed in 43).

Recently, phytoestrogens have been studied as a possible alternative treatment to ERT (13, 43, 49). Interestingly, the neuroprotective potential of certain phytoestrogens appears rooted on their antioxidant properties and may be independent from their estrogenic effects (31, 50-53).

With respect to quercetin, the major flavonoid component of the Gingko biloba extracts EGb 761 and Cp 202, it binds to both ER α and ER β with low affinity (30), and it is reported to be a potent antioxidant (31).

In our experiments, quercetin effectively reduced cellular death when administered prior to MPP⁺ to neuronal PC12 but not when given to native PC12 cells. Since MPP⁺ enter the dopaminergic neuron by using DAT, our results showing that quercetin modulates DAT protein expression in neuronal PC12 when it is used alone and also prior to oxidative damage, are original and of particular importance. They also suggest that quercetin may exert its neuroprotective role by regulating the plasticity of the tips of PC12 cells where DAT is localized (37, 38). Quercetin also moderately increases ER β protein expression when used alone. Kaempferol, the other flavonoid component of Gingko biloba extracts, could not revert cellular death in both native and neuronal PC12, rather it was found to be toxic, as already reported (16, 54). Besides, it did not wield any effect on ER β expression while decreased DAT protein levels. Our results also show that E2 and quercetin could decrease cellular death only when used in neuronal PC12 suggesting that they play a role in the complex cellular pathway between estrogenic compounds and NGF (55)

Gingko biloba extracts are widely studied for their antioxidative effects in neurons and other tissues. However, few reports detailed their possible effect on protein expression in the nervous system (17, 19). Watanabe and colleagues (17) have recently pointed out that EGb 761 may regulate a variety of genes in the central nervous system. We now confirm a clear role of Gingko biloba extracts EGb 761 and Cp 202 as modulator of ER β and DAT protein expression. Altogether these studies reveal that diet supplements with Gingko biloba extracts, marketed as therapeutic for a variety of disorders, may actually have important neuromodulatory effect and as such should be carefully analyzed. It should also be noted that several data enlighten the anti-oxidative role of the terpenoid fraction of Ginkgo biloba extracts (24, 56). In our study both EGb 761 and Cp 202, were able to rescue both native and neuronal PC12 cells from MPP⁺-induced cellular death.

Even if the flavonoid constituents of Gingko biloba extracts have been found to be active in a variety of assays, in our opinion the putative therapeutic benefits of Ginkgo biloba may reside in the synergistic effect of all its components.

Acknowledgments:

This work was support by a NSERC (Canada) grant to MGM and a FCAR-FSRQ (Québec) studentship to S.G.

LEGENDS

Figure 1: Photomicroscopy of PC12 treated with NGF (A) or without (B). Cells were induced to differentiate for 12 days with the addition of 50ng/ml NGF, as described in Materials and Methods. Magnification: X200.

Figure 2: Dose response curves for MPP⁺ induced toxicity in native (▲) and neuronal PC12 (●). The experimental conditions are described in Materials and Methods.

Figure 3 A: Effect of E2, phytoestrogens quercetin and kaempferol, and Gingko biloba extracts, EGb 761 and Cp 202, on MPP⁺ -induced toxicity in native PC12. The absorbance value obtained for the control (background) was subtracted from all other values. Control: vehicle (RPMI with stripped serum). Only a pretreatment with Cp 202 or EGb 761 prior to MPP⁺ administration can partially reverse cellular death. Statistical analysis was carried out using one-way ANOVA followed by the Dunnett multiple comparison test, where n = 6. ** p < 0.01 vs MPP⁺ alone.

Figure 3 B: Effect of E2, phytoestrogens quercetin and kaempferol, and Gingko biloba extracts, EGb 761 and Cp 202, on MPP⁺ -induced toxicity in neuronal PC12. The absorbance value obtained for the control (background) was subtracted from all other values. Control: vehicle (RPMI with stripped serum). Pretreatments with E2, quercetin, Cp 202 or EGb 761 prior to MPP⁺ administration can reverse cellular death. Statistical analysis was carried out using one-way ANOVA followed by the Dunnett multiple comparison test, where n = 6. ** p < 0.01 vs MPP⁺ alone.

Figure 4 A: Semi-quantitative immunoblots analysis showing ER β protein expression in neuronal PC12 following treatments with E2, kaempferol, quercetin, EGb 761 or Cp 202 on MPP⁺-induced cell death. Control: vehicle (RPMI with stripped serum). Western blots were performed as described in Materials and Methods. Autoradiograms were digitized, transferred into a personal computer and analyzed with the E.D.A.S. Image analysis system (Kodak). Histograms are representative of at least three separate experiments. Open bars: vehicle (ctrl) or the indicated compounds were added without MPP⁺. Hatched bars: the indicated compounds were added 24 hours prior to MPP⁺ treatment, as described in Materials and Methods. * p < 0.05 vs ctrl, ** p < 0.01 vs ctrl ; + p < 0.05 vs MPP⁺ alone.

Figure 4 B: Semi-quantitative immunoblots analysis showing DAT protein expression in neuronal PC12 following treatments with E2, kaempferol, quercetin, EGb 761 or Cp 202 on MPP⁺-induced cell death. Control: vehicle (RPMI with stripped serum). Western blots were performed as described in Materials and Methods. Autoradiograms were digitized, transferred into a personal computer and analyzed with the E.D.A.S. Image analysis system (Kodak). Histograms are representative of at least three separate experiments. Open bars: vehicle (ctrl) or the indicated compounds were added without MPP+. Hatched bars: the indicated compounds were added 24 hours prior to MPP+ treatment, as described in Materials and Methods. * $p < 0.05$ vs ctrl, ** $p < 0.01$ vs ctrl ; + $p < 0.05$ vs MPP+ alone, ++ $p < 0.01$ vs MPP+ alone.

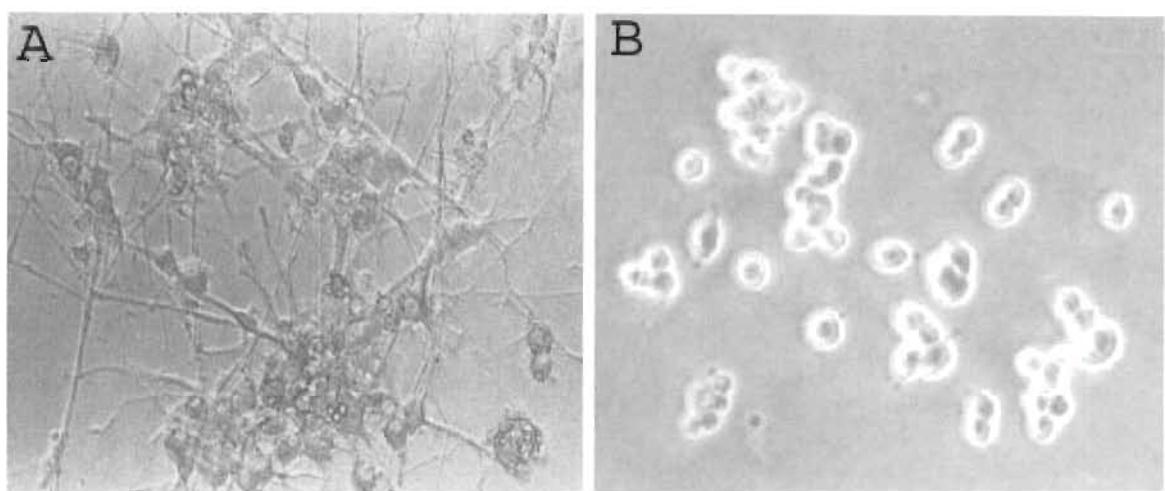
FIGURE 1

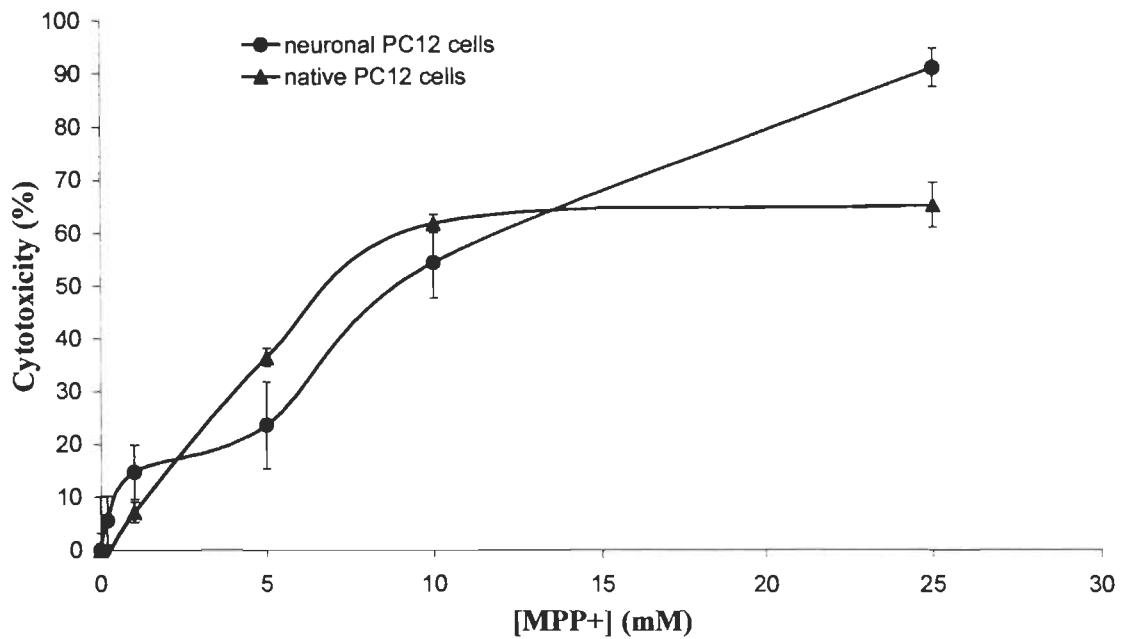
FIGURE 2

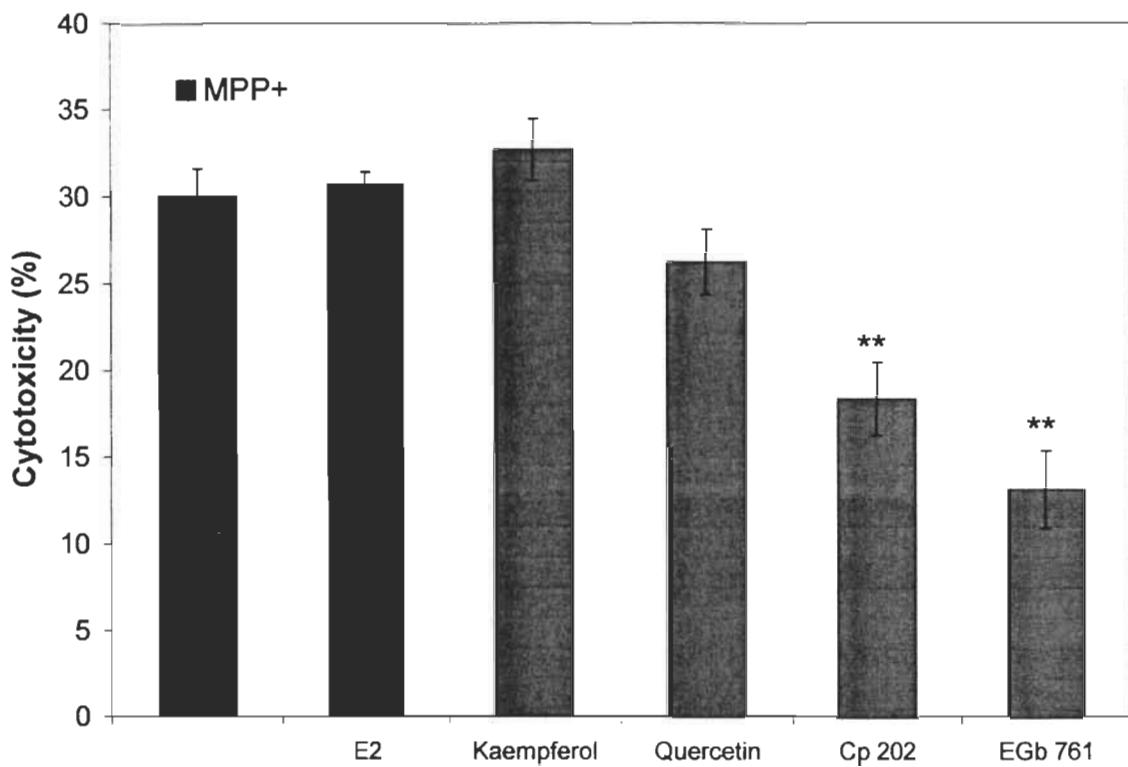
FIGURE 3a: Cytotoxicity in native PC12

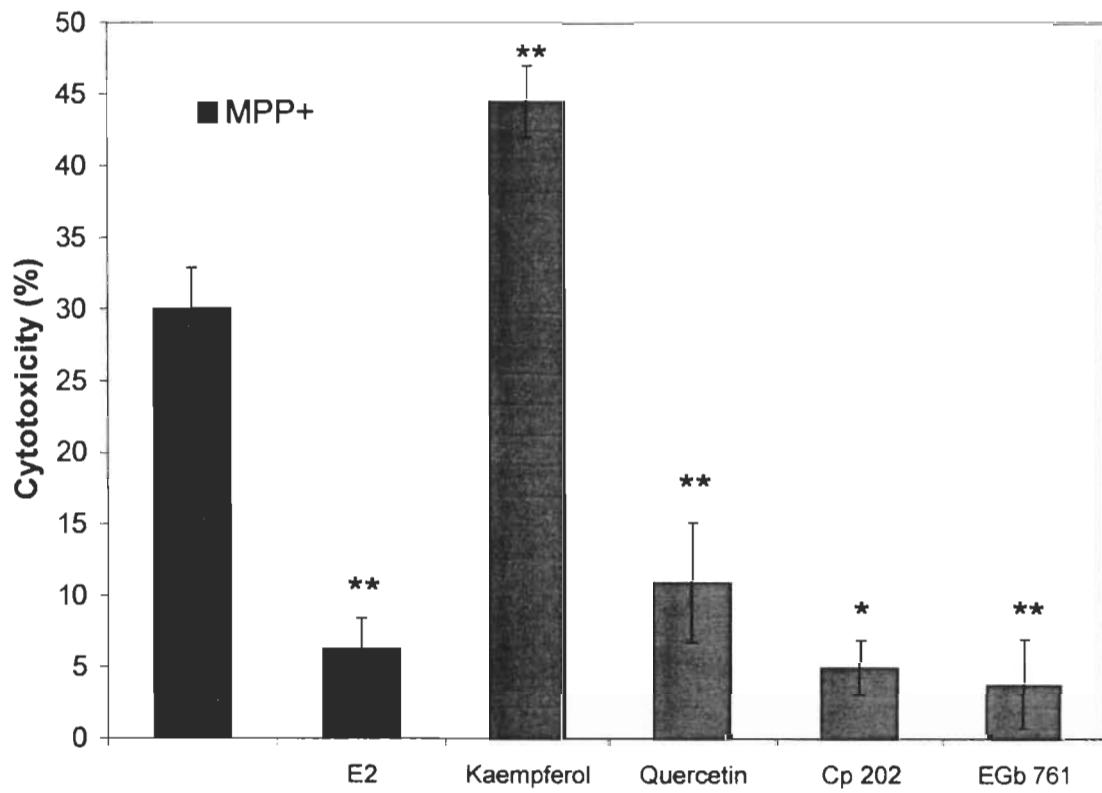
FIGURE 3b: Cytotoxicity in neuronal PC12

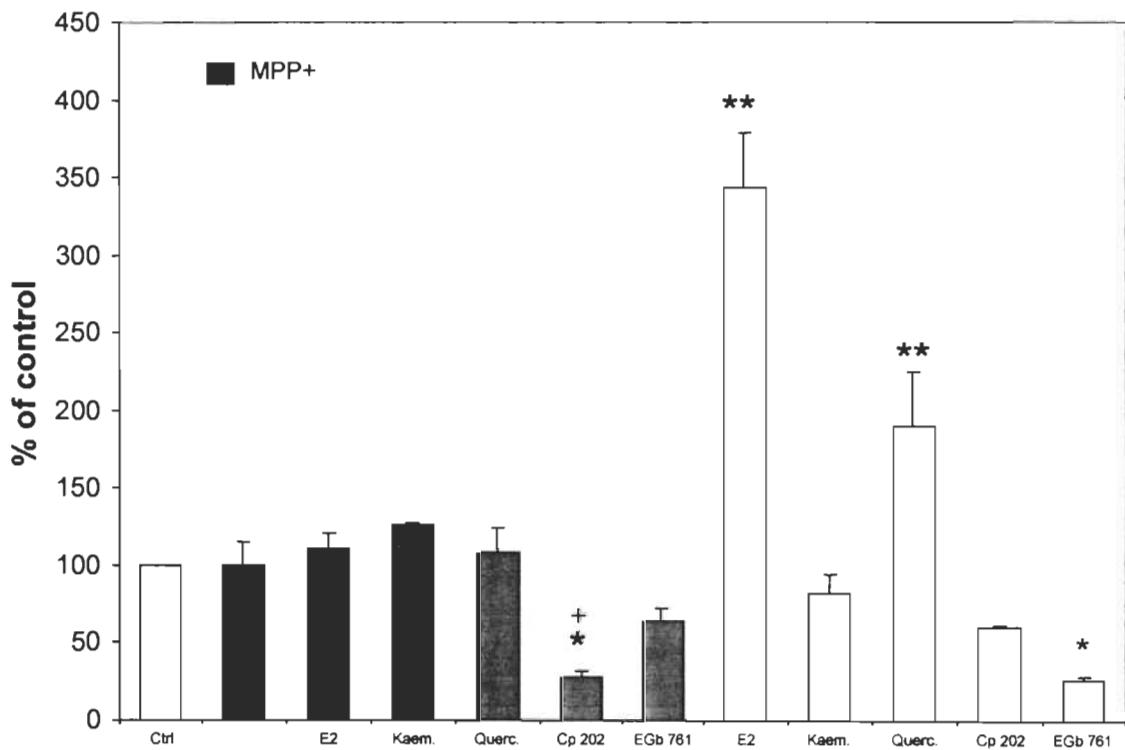
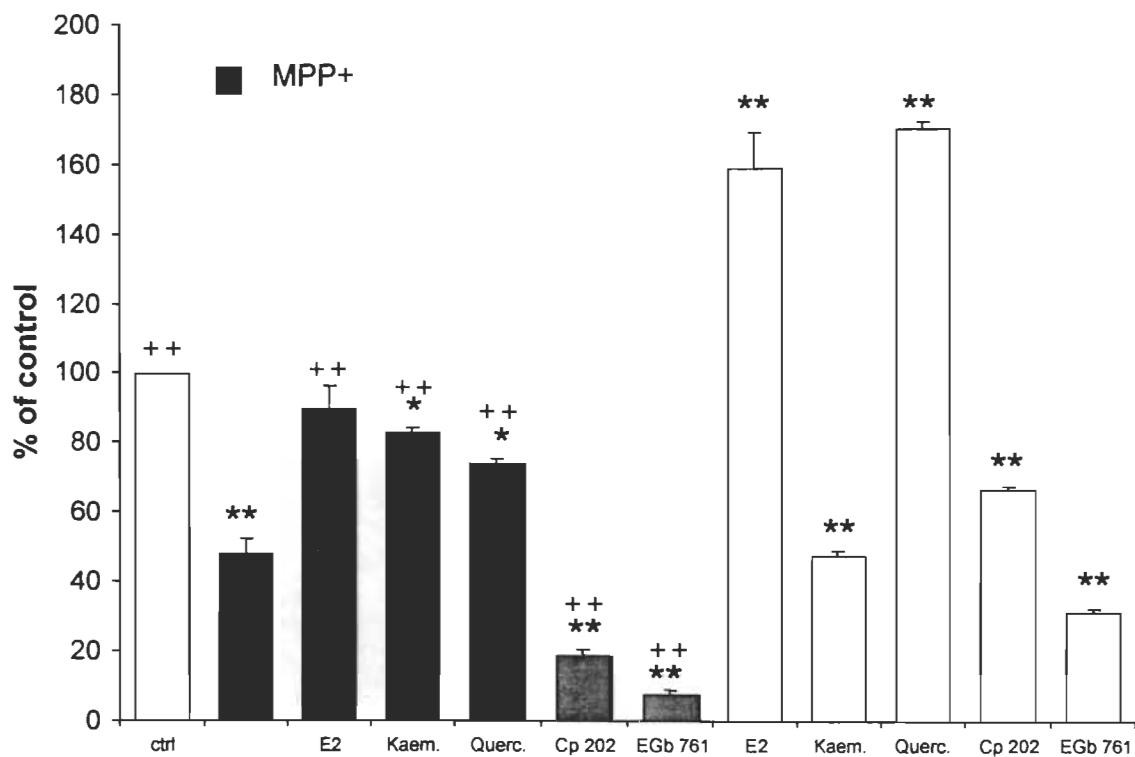
FIGURE 4a: ER β protein expression

FIGURE 4b: DAT protein expression

REFERENCES

1. Zhang, Y., Dawson, V.L., and Dawson, T.M., (2000). *Neurobiol Dis*, 7(4): 240-50.
2. Schapira, A.H., (1998). *Biochim Biophys Acta*, 1366(1-2): 225-33.
3. Beal, M.F., (1998). *Biochim Biophys Acta*, 1366(1-2): 211-23.
4. Butterfield, D.A. and Kanski, J., (2001). *Mech Ageing Dev*, 122(9): 945-62.
5. Gutteridge, J.M. and Halliwell, B. (eds.), (1996) Oxidative stress, brain iron and neurodegeneration. Basic principles: London
6. Chiba, K., Trevor, A.J., and Castagnoli, N., Jr., (1985). *Biochem Biophys Res Commun*, 128(3): 1228-32.
7. Kang, D., Miyako, K., Kurabayashi, F., Hasegawa, E., Mitsumoto, A., Nagano, T., and Takeshige, K., (1997). *Arch Biochem Biophys*, 337(1): 75-80.
8. Cleeter, M.W., Cooper, J.M., and Schapira, A.H., (1992). *J Neurochem*, 58(2): 786-9.
9. Lotharius, J., Dugan, L.L., and O'Malley, K.L., (1999). *J Neurosci*, 19(4): 1284-93.
10. Nakamura, K., Bindokas, V.P., Marks, J.D., Wright, D.A., Frim, D.M., Miller, R.J., and Kang, U.J., (2000). *Mol Pharmacol*, 58(2): 271-8.
11. Gonzalez-Polo, R.A., Mora, A., Clemente, N., Sabio, G., Centeno, F., Soler, G., and Fuentes, J.M., (2001). *Brain Res Bull*, 56(2): 119-23.
12. Przedborski, S., Vila, M., Jackson-Lewis, V.V., and Dawson, T.M., (2000). *Trends Pharmacol Sci*, 21(5): 165.
13. Lephart, E.D., West, T.W., Weber, K.S., Rhees, R.W., Setchell, K.D., Adlercreutz, H., and Lund, T.D., (2002). *Neurotoxicol Teratol*, 24(1): 5-16.
14. Mazur, W., (1998). *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 12(4): 729-42.
15. Bingham, S.A., Atkinson, C., Liggins, J., Bluck, L., and Coward, A., (1998). *Br J Nutr*, 79(5): 393-406.
16. Gelinas, S. and Martinoli, M.G., (2002). *J Neurosci Res*, 70(1): 90-6.

17. Watanabe, C.M., Wolffram, S., Ader, P., Rimbach, G., Packer, L., Maguire, J.J., Schultz, P.G., and Gohil, K., (2001). Proc Natl Acad Sci U S A, 98(12): 6577-80.
18. Yao, Z., Drieu, K., and Papadopoulos, V., (2001). Brain Res, 889(1-2): 181-90.
19. Tendi, E.A., Bosetti, F., Dasgupta, S.F., Stella, A.M., Drieu, K., and Rapoport, S.I., (2002). Neurochem Res, 27(4): 319-23.
20. Ramassamy, C., Girbe, F., Christen, Y., and Costentin, J., (1993). Free Radic Res Commun, 19(5): 341-50.
21. Bastianetto, S., Ramassamy, C., Poirier, J., and Quirion, R., (1999). Brain Res Mol Brain Res, 66(1-2): 35-41.
22. Marcocci, L., Packer, L., Droy-Lefaix, M.T., Sekaki, A., and Gardes-Albert, M., (1994). Methods Enzymol, 234: 462-75.
23. Schindowski, K., Leutner, S., Kressmann, S., Eckert, A., and Muller, W.E., (2001). J Neural Transm, 108(8-9): 969-78.
24. Zhou, L.J. and Zhu, X.Z., (2000). J Pharmacol Exp Ther, 293(3): 982-8.
25. Guidetti, C., Paracchini, S., Lucchini, S., Cambieri, M., and Marzatico, F., (2001). J Pharm Pharmacol, 53(3): 387-92.
26. Pietri, S., Seguin, J.R., d'Arbigny, P., Drieu, K., and Culcasi, M., (1997). Cardiovasc Drugs Ther, 11(2): 121-31.
27. Ramassamy, C., Clostre, F., Christen, Y., and Costentin, J., (1990). J Pharm Pharmacol, 42(11): 785-9.
28. Rojas, P., Rojas-Castaneda, J., Vigueras, R.M., and Rojas, C., (2000). Proc West Pharmacol Soc, 43: 87-8.
29. Wu, W.R. and Zhu, X.Z., (1999). Life Sci, 65(2): 157-64.
30. Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., and Gustafsson, J.A., (1998). Endocrinology, 139(10): 4252-63.
31. Moosmann, B. and Behl, C., (1999). Proc Natl Acad Sci U S A, 96(16): 8867-72.
32. Welshons, W.V., Lieberman, M.E., and Gorski, J., (1984). Nature, 307(5953): 747-9.

33. Bastianetto, S., Ramassamy, C., Christen, Y., Poirier, J., and Quirion, R., (1998). Advances in Gingko biloba Research, 7.
34. Itano, Y., Kitamura, Y., and Nomura, Y., (1994). Neurochem Int, 25(5): 419-24.
35. Fall, C.P. and Bennett, J.P., Jr., (1999). J Neurosci Res, 55(5): 620-8.
36. Roehm, N.W., Rodgers, G.H., Hatfield, S.M., and Glasebrook, A.L., (1991). J Immunol Methods, 142(2): 257-65.
37. Lee, V., Trojanowski, J.Q., and Schlaepfer, W.W., (1982). Brain Res, 238(1): 169-80.
38. Kadota, T., Yamaai, T., Saito, Y., Akita, Y., Kawashima, S., Moroi, K., Inagaki, N., and Kadota, K., (1996). J Histochem Cytochem, 44(9): 989-96.
39. Nilsen, J., Mor, G., and Naftolin, F., (1998). Menopause, 5(4): 211-6.
40. Behl, C., (2002). Nat Rev Neurosci, 3(6): 433-42.
41. Cyr, M., Calon, F., Morissette, M., Grandbois, M., Di Paolo, T., and Callier, S., (2000). Curr Pharm Des, 6(12): 1287-312.
42. Giacobini, E., (1998). Exp Gerontol, 33(7-8): 865-9.
43. Miller, M.M. and Franklin, K.B., (1999). Exp Gerontol, 34(5): 587-604.
44. Callier, S., Morissette, M., Grandbois, M., Pelaprat, D., and Di Paolo, T., (2001). Synapse, 41(2): 131-8.
45. Leranth, C., Roth, R.H., Elsworth, J.D., Naftolin, F., Horvath, T.L., and Redmond, D.E., Jr., (2000). J Neurosci, 20(23): 8604-9.
46. Sawada, H., Ibi, M., Kihara, T., Urushitani, M., Akaike, A., and Shimohama, S., (1998). J Neurosci Res, 54(5): 707-19.
47. Sherwin, B.B., (1997). Neurology, 48(5 Suppl 7): S21-6.
48. Luine, V.N., Richards, S.T., Wu, V.Y., and Beck, K.D., (1998). Horm Behav, 34(2): 149-62.
49. Seidl, M.M. and Stewart, D.E., (1998). Can Fam Physician, 44: 1299-308.
50. Behl, C., Skutella, T., Lezoualc'h, F., Post, A., Widmann, M., Newton, C.J., and Holsboer, F., (1997). Mol Pharmacol, 51(4): 535-41.
51. Behl, C. and Manthey, D., (2000). J Neurocytol, 29(5-6): 351-8.
52. Moosmann, B., Uhr, M., and Behl, C., (1997). FEBS Lett, 413(3): 467-72.

53. Vedder, H., Anthes, N., Stumm, G., Wurz, C., Behl, C., and Krieg, J.C., (1999). J Neurochem, 72(6): 2531-8.
54. Roth, A., Schaffner, W., and Hertel, C., (1999). J Neurosci Res, 57(3): 399-404.
55. Garcia-Segura L.M., Azcoitia I., and DonCarlos L.L (2001). Progress in Neurobiol., 63: 29-60.
56. Ahlemeyer B., Selke D., Schaper C., Klumpp S., and Krieglestein J. (2001). Eur. J. Pharmacol. 430: 1-7.

CHAPITRE III : RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Ce chapitre regroupe les résultats obtenus sur le présent sujet de recherche, mais qui ne figurent pas dans l'article scientifique précédent. Ces résultats permettent de répondre au troisième objectif de ce travail de maîtrise, c'est-à-dire de vérifier le pouvoir des phytoestrogènes de capter directement les radicaux libres.

3.1 Dose-réponse du PQ sur les cellules PC12 différencierées

Le PQ a été utilisé comme générateur primaire de radicaux libres. Même si son mode d'action sur les cellules PC12 n'est pas encore bien documenté, la production de radicaux libres est, quant à elle, certaine[59]. Les résultats obtenus nous montrent une mort cellulaire de 40% chez les cellules différencierées pour une concentration de 1mM. Ces expériences, contrairement à celles utilisant le MPP+ pour une période de 24 heures, ont été faites sur une période de 8 heures et démontrent bien l'effet toxique de cet herbicide sur les cellules PC12.

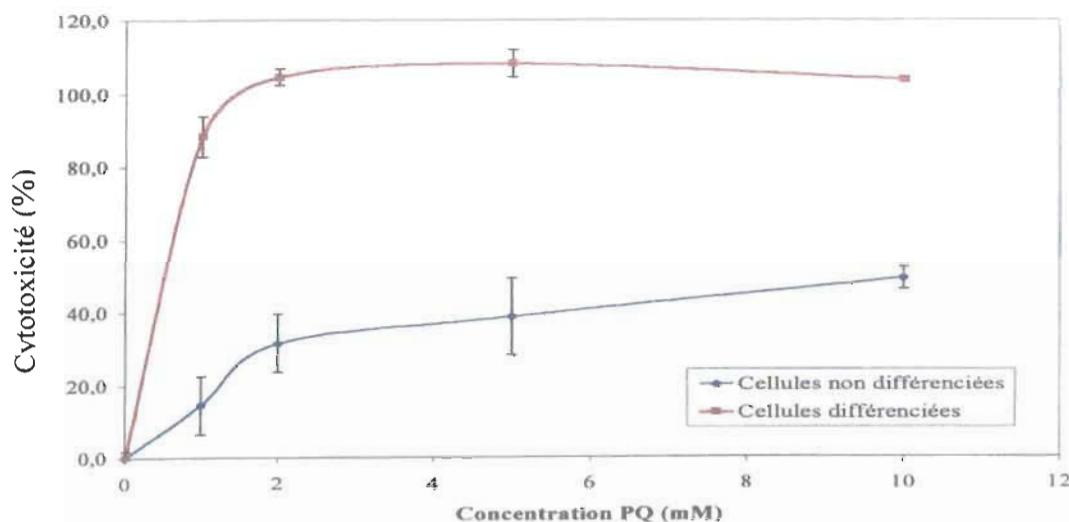


FIGURE 3.1 : Graphique de la dose/réponse du PQ : Évaluation de la cytotoxicité du PQ à différentes concentrations sur les cellules PC12 non différencierées et différencierées en phénotype neuronal sur une période de 8 heures.

3.2 Dihydrorhodamine 123

Les résultats présentés dans l'article scientifique (CHAPITRE II) démontrent bien le pouvoir de certains phytoestrogènes et des extraits de Ginkgo biloba à agir dans la neuroprotection selon une réponse tardive, impliquant une transcription d'ADN. Toutefois, l'évaluation de la réponse directe (non génomique) n'a pas fait l'objet de la précédente étude. Cette réponse suggèrerait la possibilité que les phytoestrogènes puissent capter directement les radicaux libres et les neutraliser, au même titre que l'E₂[60]. Tel que mentionné précédemment, l'implication des radicaux libres dans la neurodégénérescence de la substance noire mésencéphalique est très forte. Des études antérieures ont permis de mettre en évidence le pouvoir toxique du MPP+, sans le relier directement à la genèse de radicaux libres. Le PQ est, quant à lui, capable de générer des radicaux libres. Nous avons alors voulu vérifier la capacité des phytoestrogènes à capter et neutraliser les radicaux libres dans les cellules PC12. Comme il s'agit d'une étude complémentaire et que son rôle dans la neuroprotection est déjà bien établi [61, 62], la quercitine a été utilisée.

3.2.1 Protocole de la dihydrorhodamine 123

L'oxydation de la dihydrorhodamine 123 en rhodamine, par les radicaux libres, peut être utilisée afin de vérifier si les phytoestrogènes agissent comme « trappeurs » d'électrons libres. Cette technique consiste à traiter les cellules PC12 avec les phytoestrogènes et la toxine oxydative appropriée (le PQ) sur des lames à chambre. Après 8 heures d'incubation en présence de PQ, le surnageant est retiré des chambres, puis les cellules sont lavées à l'aide d'un tampon de type PBS. Les cellules sont fixées à la paraformaldéhyde (4%), ce qui permet d'arrêter la dédration des organites, mais aussi des radicaux libres. Leur membrane est ensuite perméabilisée avec 0,1% de Triton-X. Les lames sont mises en contact avec une solution de dihydrorhodamine 123. L'oxydation de cette dernière à l'intérieur des cellules par les radicaux libres permet la fluorescence de la rhodamine (un marqueur fluorescent)[63]. Il devient possible

d'observer en microscopie à fluorescence et de comparer qualitativement l'effet des phytoestrogènes sur les radicaux libres grâce à un système d'analyse d'image et selon la fluorescence émise. Plus les cellules émettent de fluorescence, plus la dihydrorhodamine 123 a été oxydée, donc plus il y avait de radicaux libres à l'intérieur de la cellule.

3.2.2 Résultats

Puisqu'il est normal d'observer un niveau de base de radicaux libres dans les cellules, il est possible de comparer les cellules traitées avec et sans phytoestrogènes (figure 3.2 : contrôle et Quercitine). Ainsi, l'analyse des images permet d'affirmer qu'il y a une moins forte fluorescence dans les cellules traitées avec la quercitine comparativement à celles sans traitement (figure 3.2). Ces résultats confirment donc nos hypothèses sur l'efficacité des phytoestrogènes à capter directement les radicaux libres normalement produits par la cellule.

C'est afin de vérifier le pouvoir des phytoestrogènes en situation de stress oxydatif que l'expérience a été reproduite, avec l'ajout de PQ. Ces nouveaux résultats suggèrent que le PQ, utilisé seul, produit des radicaux libres (figure 3.2). En effet, les cellules émettent une forte fluorescence qui correspond à cette attaque radicalaire (figure 3.2 : PQ). L'ajout de quercitine aux cellules traitées par le PQ semble favoriser la survie cellulaire (figure 3.2 : PQ + Quercitine), ce qui concorde avec les résultats du dosage de la LDH. Ainsi, les phytoestrogènes pourraient agir directement sur la capture des radicaux libres et ce, même lorsque ces derniers sont présents en grande quantité.

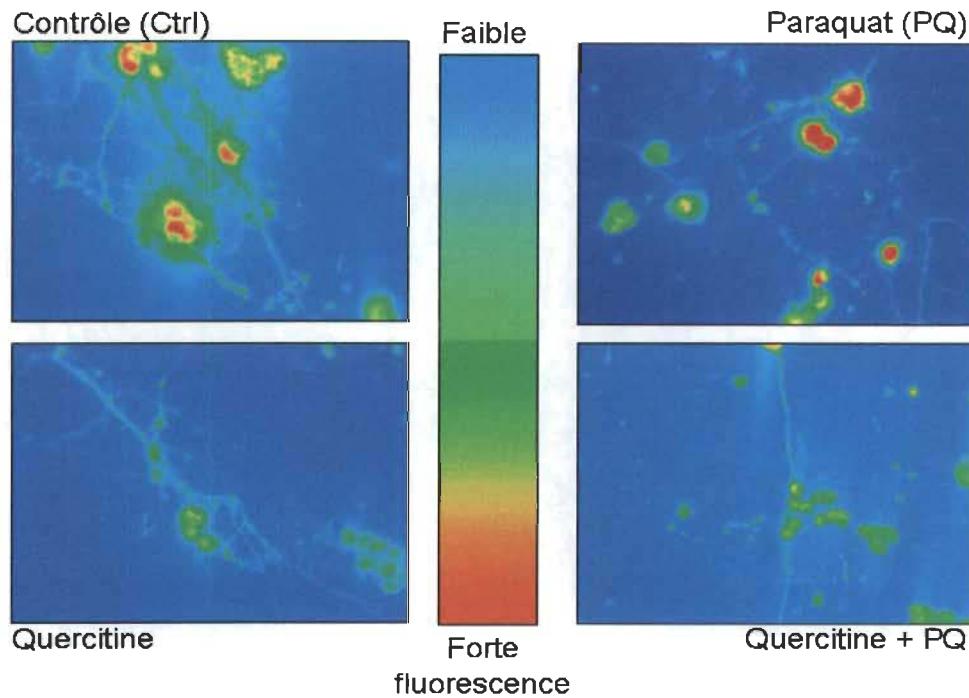


FIGURE 3.2: Cellules PC12 différencierées marquées à la rhodamine : la coloration du jaune au rouge représente de forte concentration de radicaux libres. Les cellules contrôles et contenant le PQ présentent de forte concentration de radicaux libres, comparativement aux cellules traitées avec la quercitine, où leur concentration est plus faible.

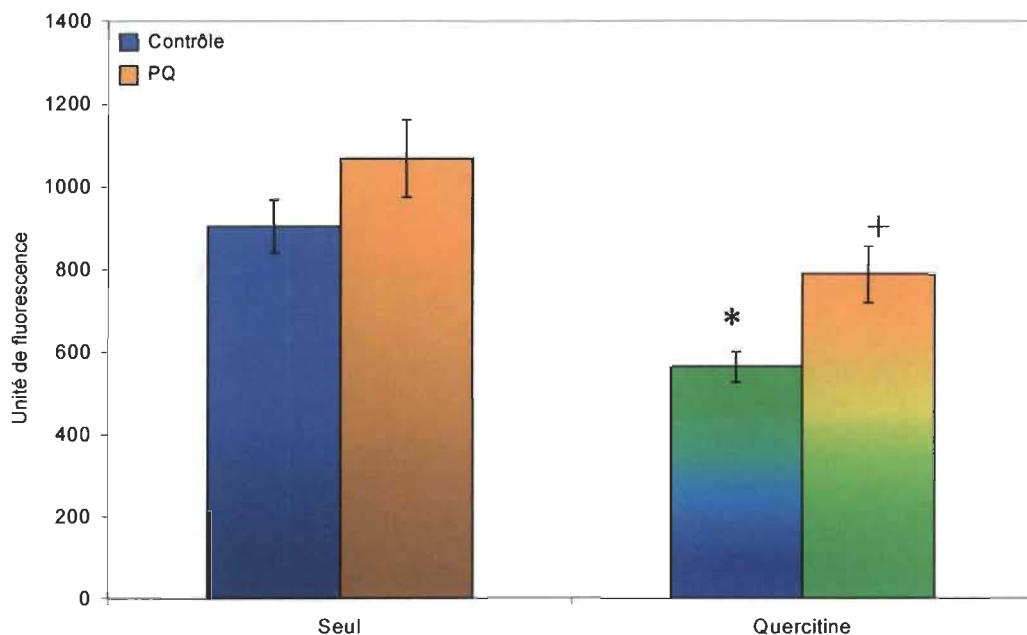


FIGURE 3.3 : Graphique de l'analyse d'image de la fluorescence émise par les cellules PC12 non différencierées traitées à la dihydrorhodamine 123.

CHAPITRE IV :

DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1 Discussion

4.1.1 Réponses aux objectifs

Le premier objectif de ce travail de maîtrise était de déterminer le pouvoir neuroprotecteur des phytoestrogènes contre un stress oxydatif de nature exogène. L'évaluation de la cytotoxicité par le dosage de la LDH a d'abord permis de vérifier l'effet toxique du MPP+ sur les cellules PC12. Par la suite, le traitement des cellules PC12 non différencierées et différencierées en phénotype neuronal avec des phytoestrogènes a révélé le pouvoir neuroprotecteur de ceux-ci contre l'attaque du MPP+. Cette protection n'est offerte que par les deux extraits de Ginkgo biloba sur les cellules non différencierées. Dans le cas des cellules différencierées, tant les extraits de Ginkgo biloba que le β E₂ et la quercitine protègent contre un stress oxydatif.

Deuxièmement, l'efficacité de ces phytoestrogènes a été mesurée sur l'expression de certaines protéines clés dans la neuroprotection et dans la régulation de la voie nigrostriatale saine. L'analyse par immunobuvardage de type « Western blot » a donc démontré l'implication des phytoestrogènes sur le taux d'expression du β ER et du DAT. Bien que l'influence du β E₂ sur son récepteur (β ER) eut été bien connue[39], l'effet des phytoestrogènes sur ce récepteur n'était pas documenté. La quercitine semble mimer l'effet du β E₂ en agissant comme agoniste du β ER, favorisant alors l'expression de cette protéine. Ces résultats suggèrent que la quercitine emprunte la voie de neuroprotection par le β ER, menant ainsi à la transcription de plusieurs protéines anti-apoptotiques et du cytosquelette (FIG. 1.5). Les extraits de Ginkgo biloba agissent à l'opposé de la quercitine. En effet, ils modulent à la baisse l'expression du β ER. Ces résultats suggèrent donc que le mécanisme d'action de ces deux extraits dans la neuroprotection se fasse via une autre voie que celle du β ER.

Comme l'expression du β ER est à la baisse, il se peut même que le Ginkgo biloba agisse comme antagoniste de ce récepteur.

Toutefois, il faut aussi considérer que les deux extraits sont composés de plusieurs substances et que l'action combinée de celles-ci puisse être à l'origine des propriétés du Ginkgo biloba. Par ailleurs, l'expression du DAT qui est fonction de la quantité du DA et de certaines toxines environnementales (comme le MPP+ qui utilise le DAT pour pénétrer à l'intérieur de la cellule) a aussi été modulée. En plus d'être responsable d'environ 40% de mort cellulaire, l'utilisation du MPP+ a pour effet d'abaisser le niveau d'expression du DAT sur les cellules survivantes. Il en est de même dans la MP au niveau du putamen, du caudé et du noyaux accubens où le DAT est aussi exprimé en moins grande quantité[64]. Les résultats de ce projet de maîtrise suggèrent que le β E₂, le kaempférol et la quercitine modulent à la hausse l'expression du transporteur en présence de MPP+, tandis que les deux extraits de Ginkgo biloba le modulaient à la baisse. La modulation à la hausse du DAT par le β E₂, le kaempférol et la quercitine suggère que la recapture de DA soit affectée par un traitement avec ces phytoestrogènes. Toutefois, une plus grande expression du DAT favorise aussi une plus grande facilité pour le MPP+ à pénétrer à l'intérieur de la cellule. Il est aussi démontré que l'expression du DAT en présence de MPP+ et de kaempférol est supérieur au taux d'expression du DAT en présence des composés utilisés seuls. Ces résultats suggèrent donc que ces produits agissent en synergie pour faciliter l'entrée de MPP+ à l'intérieur de la cellule et ainsi causer sa mort. Même si pour l'instant il nous est impossible d'expliquer ce résultat, cet effet concorde avec les résultats du dosage de la LDH. En effet, la cytotoxicité induite par le mélange de kaempférol et de MPP+ est supérieure à la cytotoxicité induite seulement par le MPP+ (Chapitre II : figure 3a et 3b). Pour ce qui est des extraits de Ginkgo biloba, ils pourraient agir comme neuroprotecteur en modulant le DAT, réduisant ainsi la quantité de toxines (MPP+) qui pénétrera à l'intérieur des cellules. La modulation de protéines implique une régulation tardive grâce à l'activation de facteurs de transcription au niveau de l'ADN. Afin de vérifier la réponse directe des phytoestrogènes, le marquage des radicaux libres par la

rhodamine à l'intérieur des cellules en culture a été fait. En utilisant le PQ, comme générateur direct de radicaux libres, il a été possible de vérifier le pouvoir du β E₂, de la quercitine et du resvératrol à « piéger » ces radicaux libres et ainsi réduire la cytotoxicité induite par cette toxine. Selon les résultats obtenus, les phytoestrogènes sont capables de capter tant les radicaux libres produits normalement par les cellules que ceux produits par un stress oxydatif exogène (PQ).

4.1.2 Nouvelles perspectives de recherche

4.1.2.1 Toxines environnementales

Plusieurs recherches sont présentement en cours avec la roténone, un herbicide inhibiteur du complexe I mitochondrial tout comme le MPP+. En plus de créer des radicaux libres, la roténone produit des corps de Lewy dans les modèles animaux[65]. Nous avons donc tenté son utilisation sur les cellules PC12, tant différenciées que non-différenciées. Toutefois, nos recherches faites avec cet herbicide n'ont pas été concluantes. Cette toxine semblait agir de façon aléatoire et de façon trop毒ique. Pour palier les résultats contradictoires, nous avons substitué le milieu RPMI normalement utilisé, pour un milieu D-MEM (Dulbecco minimal essential medium) sans glucose. Le choix de ce nouveau milieu repose sur le fait que la roténone est une molécule possédant une forte affinité pour le glucose[66]. Ainsi, en étant entouré de glucose, elle deviendrait incapable de pénétrer à l'intérieur des cellules et d'exercer sa toxicité. Malgré, ces nouvelles précautions, les résultats obtenus sur les PC12 n'ont jamais été plus concluant. C'est pourquoi nous avons remplacé cet herbicide pour l'atrazine. Ce dernier, qui est toujours utilisé au Canada mais prohibé en Europe, serait, selon les études, non toxique à la consommation par l'être humain. Utilisé depuis le début des années 50, cet herbicide de la famille des chlorotriazines inhibe la photosynthèse, bloquant la synthèse d'ATP. L'atrazine agirait au niveau de la synthèse de la plastoquinine, une protéine encodée par le gène psbA du complexe réactif du photosystème-II. C'est le métabolite de dégradation, l'hydroxyatrazine, qui peut être le plus néfaste pour l'environnement, puisqu'il possède un temps de demi-vie entre 2 700

et 3 400 jours [67]. En restant aussi longtemps dans les sols, il est possible que ce métabolite puisse se retrouver dans la nappe phréatique et contaminer les terres agricoles et les puits souterrains, puis être consommé par l'homme. Puisque l'atrazine agit sur une protéine spécifique aux végétaux et absente chez l'humain, les effets toxiques de l'atrazine chez l'humain n'ont pas été considérés sérieusement. Toutefois, les recherches récentes sur l'atrazine ont prouvé qu'elle avait un effet毒ique sur le cycle menstruel de la rate[67]. De plus, cet herbicide favorisait le développement du cancer du sein et inhiberait la synthèse des catécholamines, dont la DA; d'où son implication possible avec la MP [68]. Nos études préliminaires nous démontrent bel et bien le pouvoir toxique de l'atrazine sur les cellules PC12.

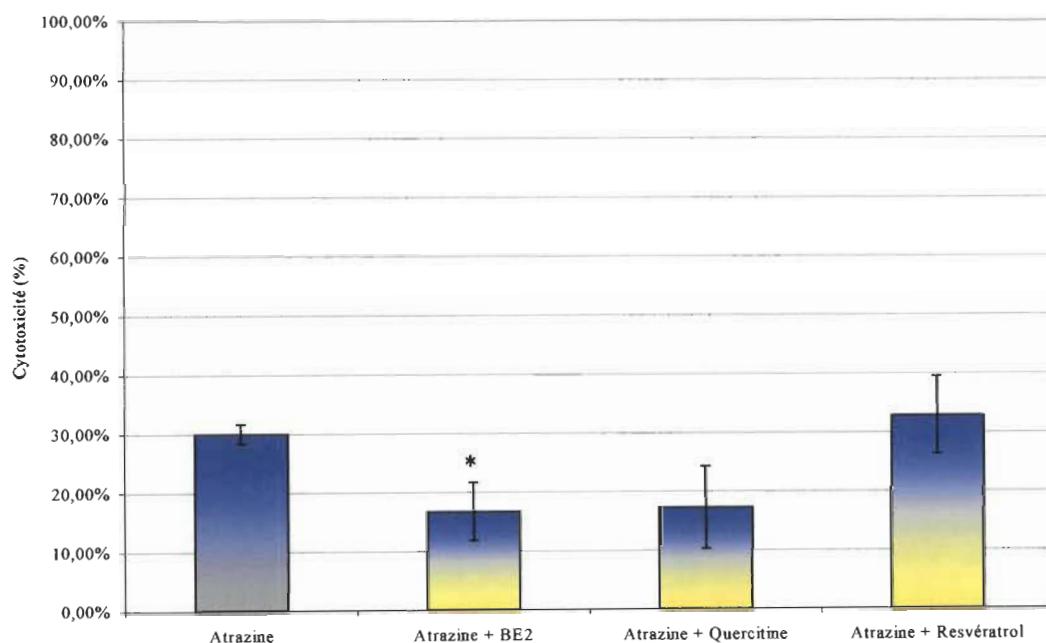


FIGURE 4.1: Graphique de l'effet de l'atrazine sur les cellules PC12 non-différenciées : L'atrazine utilisée seule, à une concentration de 0,1mg/ml est capable d'induire une cytotoxicité comparable à celle du PQ et du MPP+. De plus, un prétraitement au β E₂ a un effet protecteur contre cette cytotoxicité. À priori, la quercitrine et le resvératrol ne produisent pas d'effet sur l'attaque toxique de l'atrazine.

Bien que nos travaux de recherche se concentrent principalement sur l'effet de phytoestrogènes sur les cellules PC12 ayant subit l'attaque de pesticides/herbicides, de nouvelles études pourraient être menées avec différents moyens pour induire la mort neuronale. En effet, l'étiologie de cette maladie étant toujours inconnue, nous ne pouvons pas exclure les autres hypothèses sur les causes de la MP. Il devient donc primordial d'évaluer l'effet sur le système en général, et sortir du contexte *in vitro*.

4.1.2.2 Étude *in vivo*

Les résultats présentés sont des résultats obtenus *in vitro*. L'utilisation de culture cellulaire permet d'avoir des résultats rapidement et permet la reproductibilité de ces résultats. De plus, il devient plus facile d'obtenir l'effet des phytoestrogènes sur des protéines cibles de cellules choisies. Par contre, l'utilisation d'une culture cellulaire ne permet que l'observation du point de vue cellulaire et non pas en tant que système. Dans le cas de la MP, ce sont les neurones dopaminergiques de la substance noire qui sont détruits, d'où l'utilisation de cellules PC12. Toutefois, l'effet de ce manque de DA se reflète sur le striatum et indirectement sur le cortex moteur. Une culture cellulaire n'est donc pas représentative de ce réseau neuronal. C'est pourquoi cette présente étude n'est qu'une étude préliminaire. Puisque les expériences se sont avérées positives, il serait des plus intéressant de reproduire ces résultats dans un contexte *in vivo*. Il serait ainsi possible de vérifier l'effet des phytoestrogènes sur le mésencéphale et les noyaux gris centraux. Une diète à base de phytoestrogènes pourrait être administrée à un modèle animal dans un but préventif. Par la suite, une toxine, peut être injectée à l'animal pour détruire la substance noire mésencéphalique et reproduire les symptômes parkinsoniens. L'analyse des cerveaux pourrait alors nous révéler l'efficacité d'une diète riche en phytoestrogènes. De plus, il serait possible de déterminer l'effet des phytoestrogènes sur les autres neurones et cellules gliales.

Comme l'étiologie de cette maladie reste encore inconnue, la prévention s'avère le seul vrai moyen pour combattre la MP. Une thérapie à base de phytoestrogènes pourrait alors être utilisée ce qui réduirait les effets secondaires indésirables produits par les autres approches pharmacologiques. Une alimentation saine, comportant des phytoestrogènes, ou la prise de suppléments alimentaires pourrait réduire considérablement les risques de développer la MP et de nombreuses autres neuropathologies. Afin de vérifier le réel pouvoir des phytoestrogènes contenus dans une telle prise, il faudrait vérifier s'ils sont digérés, puis absorbés, par l'intestin. En effet, comme dans notre cas il s'agit d'une étude *in vitro*, nous ne savons pas si les phytoestrogènes, bien que lipophiles, soient capables de d'agir au niveau du cerveau. Il se pourrait que le Ginkgo biloba ne soit même pas digéré par les sucs gastriques, où bien qu'ils soient totalement dégradés par ces dernières ou bien par l'acidité de l'estomac. Des études complémentaires utilisant les systèmes enzymatiques gastriques pourraient être menées afin de vérifier ces hypothèses. Dans ce cas, l'utilisation d'un modèle *in vivo* devient nécessaire.

4.1.3 Causes d'erreurs

Une fois de plus, comme nos recherches se font dans l'optique de prévention, l'effet évalué est celui des phytoestrogènes sur le PQ ou le MPP+ et non pas directement sur les radicaux libres. Il se pourrait alors que les extraits utilisés interagissent avec les toxines avant même qu'ils ne puissent agir sur les cellules. En effet, selon notre protocole, les cellules sont d'abord soumises à un pré-traitement de 24 heures puis soumises à la toxine oxydante. Advenant cette hypothèse et le cas que la MP ne soit pas causée par ces deux toxines, l'utilisation de phytoestrogènes pourrait s'avérer inefficace pour la prévention de cette neurodégénérescence.

Par ailleurs, les concentrations de PQ utilisées (1mM) correspondent à 186mg/L soit cinq fois supérieure à la dose létale (35mg/L). Bien que les différentes études

utilisant le PQ font mention de telles concentrations, les résultats *in vitro* ne sont donc pas représentatifs de la situation *in vivo*. L'utilisation du PQ a donc été faite dans le but d'obtenir une mort cellulaire pouvant causer les mêmes dommages cellulaires que dans un contexte parkinsonien : la destruction de la substance noire mésencéphalique ou des PC12 par une attaque radicalaire et une peroxydation lipidique. En effet, comme mentionné dans l'introduction, il y a une présence importante de radicaux libres dans cette région spécifique du cerveau. Même si la cause de leur présence reste inconnue, il est possible de trouver des moyens pour réduire leur concentration.

4.2 Conclusion

L'étude des phytoestrogènes nous a permis de montrer leurs effets neuroprotecteurs sur les cellules PC12 en culture. Ces effets sont le résultat de leur capacité à pouvoir agir partiellement sur le β ER, ce qui aurait pour conséquence d'activer une cascade de transcription, favorisant la neuroprotection (FIG. 1.5). Toutefois, comme les extraits de Ginkgo biloba semblent moduler à la baisse l'expression du β ER, il est possible qu'ils agissent comme antagonistes de ce récepteur. En effet, des études antérieures ont prouvées que certains phytoestrogènes peuvent agir comme antagoniste du β ER en ayant une affinité beaucoup moindre que l'E₂ pour ce récepteur [46]. Physiologiquement, ces résultats nous prouvent que l'utilisation des extraits de Ginkgo biloba, dans l'optique d'une thérapie préventive, pourrait se faire et ce, sans comporter les effets indésirables de l'hormonothérapie oestrogénique. Tel que mentionné dans l'introduction, les oestrogènes ont un fort pouvoir mitotique qui peut mener à la formation de carcinomes; principalement au niveau de la glande mammaire[44]. De plus, en diminuant le taux de DAT, il est même possible que les chances de développer la MP soient diminuées en conséquence, advenant le cas qu'une toxine environnementale contribue à l'étiologie de cette maladie.

Cette étude nous a donc permis de confirmer certaines études antérieures et mettre en évidence, pour la première fois, les effets modulateurs que semblent avoir les phytoestrogènes sur l'expression des protéines. Dans notre cas, et selon notre modèle expérimental, le Ginkgo biloba et sa composante principale, la quercitine, joueraient un rôle majeur dans la prévention de la MP en modulant certaines protéines normalement touchées, telle que le DAT, lors de cette neurodégénérescence.

Comme les résultats obtenus sont favorables à l'administration préventive d'extrait de Ginkgo biloba et de phytoestrogènes, il serait possible de les inclure dans notre alimentation. Malheureusement, bien qu'efficace, une telle utilisation ne serait que d'un point de vue préventif et non pas curatif. C'est pourquoi, les recherches sur l'étiologie et sur les traitements sont d'autant plus importantes afin d'apporter un support nécessaire aux personnes déjà atteinte de pareilles démences. Avec une population vieillissante comme la nôtre, il devient primordial de trouver des solutions aux problèmes occasionnés par ces maladies touchant à priori les personnes âgées. Les chirurgies, comme la SCP, peuvent être de bonnes solutions pour les symptômes, sans toutefois guérir les patients. L'utilisation de cellules embryonnaires pourrait être une voie des plus intéressantes. En effet, une telle greffe deviendrait un moyen efficace pour remédier à la carence en DA, tout en régénérant les régions détruites.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kontakos, N. and J. Stokes, *Monograph series on aging-related diseases: XII. Parkinson's disease--recent developments and new directions*. Chronic Dis Can, 1999. **20**(2): p. 58-76.
2. Przedborski, S., et al., *Reply: a new look at the pathogenesis of Parkinson's disease*. Trends Pharmacol Sci, 2000. **21**(5): p. 165.
3. Butterfield, D.A. and J. Kanski, *Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins*. Mech Ageing Dev, 2001. **122**(9): p. 945-62.
4. Zhang, Y., V.L. Dawson, and T.M. Dawson, *Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease*. Neurobiol Dis, 2000. **7**(4): p. 240-50.
5. Wesseling, C., et al., *Paraquat in developing countries*. Int J Occup Environ Health, 2001. **7**(4): p. 275-86.
6. Langston, J.W., *Epidemiology versus genetics in Parkinson's disease: progress in resolving an age-old debate*. Ann Neurol, 1998. **44**(3 Suppl 1): p. S45-52.
7. Tanner, C.M., *Occupational and environmental causes of parkinsonism*. Occup Med, 1992. **7**(3): p. 503-13.
8. Prasad, C., et al., *Chronic nicotine intake decelerates aging of nigrostriatal dopaminergic neurons*. Life Sci, 1994. **54**(16): p. 1169-84.
9. Jackson, D.M. and A. Westlind-Danielsson, *Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects*. Pharmacol Ther, 1994. **64**(2): p. 291-370.
10. Mill, J., et al., *Polymorphisms in the dopamine D4 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder*. Neuroreport, 2003. **14**(11): p. 1463-6.
11. Kimmel, H.L., et al., *Dopamine D1 and D2 receptors influence dopamine transporter synthesis and degradation in the rat*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **298**(1): p. 129-40.
12. Gray, F., *Neuropathologie des syndromes parkinsoniens*. Rév. Neurologique, 1988. **144**(4): p. 229-248.
13. Kishore, A. and B.J. Snow, *Drug management of Parkinson's disease*. Can Fam Physician, 1996. **42**: p. 946-52.
14. Stacy, M. and H.J. Brownlee, *Treatment options for early Parkinson's disease*. Am Fam Physician, 1996. **53**(4): p. 1281-7.
15. Shannon, K.M., et al., *Stereotactic pallidotomy for the treatment of Parkinson's disease. Efficacy and adverse effects at 6 months in 26 patients*. Neurology, 1998. **50**(2): p. 434-8.
16. Cochen, V., et al., *Transplantation in Parkinson's disease: PET changes correlate with the amount of grafted tissue*. Mov Disord, 2003. **18**(8): p. 928-32.
17. Cadet, J.L. and C. Brannock, *Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems*. Neurochem Int, 1998. **32**(2): p. 117-31.

18. Gutteridge, J.M. and B. Halliwell, *Oxidative stress, brain iron and neurodegeneration. Basic principles*, in *Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson's disease*, P.J. C.W. Olanow, M. and Y.p.L. London, Editors. 1996.
19. Jenner, P., *Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease*. Mov Disord, 1998. **13**(Suppl 1): p. 24-34.
20. Gelinas, S., et al., *Effect of oxidative stress on stability and structure of neurofilament proteins*. Biochem Cell Biol, 2000. **78**(6): p. 667-74.
21. Chiba, K., A.J. Trevor, and N. Castagnoli, Jr., *Active uptake of MPP+, a metabolite of MPTP, by brain synaptosomes*. Biochem Biophys Res Commun, 1985. **128**(3): p. 1228-32.
22. Duan, W. and M.P. Mattson, *Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration improve behavioral outcome and reduce degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease*. J Neurosci Res, 1999. **57**(2): p. 195-206.
23. Schapira, A.H., *Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1366**(1-2): p. 225-33.
24. Beal, M.F., *Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1366**(1-2): p. 211-23.
25. Kang, D., et al., *Changes of energy metabolism induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-related compounds in rat pheochromocytoma PC12 cells*. Arch Biochem Biophys, 1997. **337**(1): p. 75-80.
26. Cleeter, M.W., J.M. Cooper, and A.H. Schapira, *Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement*. J Neurochem, 1992. **58**(2): p. 786-9.
27. Betarbet, R., T.B. Sherer, and J.T. Greenamyre, *Animal models of Parkinson's disease*. Bioessays, 2002. **24**(4): p. 308-18.
28. Seaton, T.A., J.M. Cooper, and A.H. Schapira, *Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors*. Brain Res, 1997. **777**(1-2): p. 110-8.
29. Albanese, A., et al., *Functional impairment of nigrostriatal neurons progresses following withdrawal of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*. Neuroscience, 1996. **75**(4): p. 1185-1191.
30. Corasaniti, M.T., et al., *Paraquat: a useful tool for the in vivo study of mechanisms of neuronal cell death*. Pharmacol Toxicol, 1998. **83**(1): p. 1-7.
31. Greenamyre, J.T., R. Betarbet, and T.B. Sherer, *The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria*. Parkinsonism Relat Disord, 2003. **9 Suppl 2**: p. S59-64.
32. Hirsch, E.C., et al., *Animal models of Parkinson's disease in rodents induced by toxins: an update*. J Neural Transm Suppl, 2003(65): p. 89-100.
33. Tsuruga, M., et al., *Differential effects of vitamin E and three hydrophilic antioxidants on the actinomycin D-induced and colcemid-accelerated apoptosis in human leukemia CMK-7 cell line*. Mol Cell Biochem, 2003. **250**(1-2): p. 131-7.
34. Giacobini, E., *Aging, Alzheimer's disease, and estrogen therapy*. Exp Gerontol, 1998. **33**(7-8): p. 865-9.

35. Inestrosa, N.C., M.-P. Marzolo, and A.B. Bonnefont, *Cellular and molecular basic of estrogen's neuroprotection*. Molecular neurobiology, 1998. **17**: p. 73-86.
36. Sawada, H. and S. Shimohama, *Neuroprotective effects of estradiol in mesencephalic dopaminergic neurons*. Neuroscience and biobehavioral, 2000: p. 143-147.
37. Behl, C., *Oestrogen as a neuroprotective hormone*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(6): p. 433-42.
38. Toran-Allerand, C.D., M. Singh, and G.J. Setalo, *Novel Mechanisms of Estrogen action in the Brain: New players in an old story*. Frontiers in Neuroendocrinology, 1999. **20**: p. 97-121.
39. Dechering, K., C. Boersma, and S. Mosselman, *Estrogen receptors alpha and beta: two receptors of a kind?* Curr Med Chem, 2000. **7**(5): p. 561-76.
40. Gelinas, S. and M.G. Martinoli, *Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP⁺-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells*. J Neurosci Res, 2002. **70**(1): p. 90-6.
41. Callier, S., et al., *Neuroprotective properties of 17beta-estradiol, progesterone, and raloxifene in MPTP C57Bl/6 mice*. Synapse, 2001. **41**(2): p. 131-8.
42. Leranth, C., et al., *Estrogen is essential for maintaining nigrostriatal dopamine neurons in primates: implications for Parkinson's disease and memory*. J Neurosci, 2000. **20**(23): p. 8604-9.
43. Sawada, H., et al., *Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal death*. J Neurosci Res, 1998. **54**(5): p. 707-19.
44. Miller, M.M. and K.B. Franklin, *Theoretical basis for the benefit of postmenopausal estrogen substitution*. Exp Gerontol, 1999. **34**(5): p. 587-604.
45. Lephart, E.D., et al., *Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens*. Neurotoxicol Teratol, 2002. **24**(1): p. 5-16.
46. Bingham, S.A., et al., *Phyto-oestrogens: where are we now?* Br J Nutr, 1998. **79**(5): p. 393-406.
47. Kuiper, G.G., et al., *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta*. Endocrinology, 1998. **139**(10): p. 4252-63.
48. Mazur, W., *Phytoestrogen content in foods*. Baillieres Clin Endocrinol Metab, 1998. **12**(4): p. 729-42.
49. Behl, C., *Vitamin E and other antioxidants in neuroprotection*. Int J Vitam Nutr Res, 1999. **69**(3): p. 213-9.
50. Watanabe, C.M., et al., *The in vivo neuromodulatory effects of the herbal medicine ginkgo biloba*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6577-80.
51. Bastianetto, S., et al., *Dehydroepiandrosterone (DHEA) protects hippocampal cells from oxidative stress-induced damage*. Brain Res Mol Brain Res, 1999. **66**(1-2): p. 35-41.
52. Marcocci, L., et al., *Antioxidant action of Ginkgo biloba extract EGb 761*. Methods Enzymol, 1994. **234**: p. 462-75.
53. Schindowski, K., et al., *Age-related increase of oxidative stress-induced apoptosis in mice prevention by Ginkgo biloba extract (EGb761)*. J Neural Transm, 2001. **108**(8-9): p. 969-78.

54. Seidl, M.M. and D.E. Stewart, *Alternative treatments for menopausal symptoms. Systematic review of scientific and lay literature*. Can Fam Physician, 1998. **44**: p. 1299-308.
55. Yao, Z., K. Drieu, and V. Papadopoulos, *The Ginkgo biloba extract EGb 761 rescues the PC12 neuronal cells from beta-amyloid-induced cell death by inhibiting the formation of beta- amyloid-derived diffusible neurotoxic ligands*. Brain Res, 2001. **889**(1-2): p. 181-90.
56. Tendi, E.A., et al., *Ginkgo biloba extracts EGb 761 and bilobalide increase NADH dehydrogenase mRNA level and mitochondrial respiratory control ratio in PC12 cells*. Neurochem Res, 2002. **27**(4): p. 319-23.
57. Ramassamy, C., et al., *Ginkgo biloba extract EGb 761 or trolox C prevent the ascorbic acid/Fe²⁺ induced decrease in synaptosomal membrane fluidity*. Free Radic Res Commun, 1993. **19**(5): p. 341-50.
58. Behl, C., et al., *17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **216**(2): p. 473-82.
59. Yang, W.-L. and A.Y. Sun, *Paraquat-Induced Free Radical Reaction in Mouse Brain Microsomes*. Neurochemical Research, 1998. **23**(1): p. 47-53.
60. Pietri, S., et al., *Ginkgo biloba extract (EGb 761) pretreatment limits free radical- induced oxidative stress in patients undergoing coronary bypass surgery*. Cardiovasc Drugs Ther, 1997. **11**(2): p. 121-31.
61. Basly, J.P., et al., *Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol*. Life Sci, 2000. **66**(9): p. 769-77.
62. Fremont, L., *Biological effects of resveratrol*. Life Sci, 2000. **66**(8): p. 663-73.
63. Crow, J.P., *Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species*. Nitric Oxide, 1997. **1**(2): p. 145-57.
64. Miller, G.W., et al., *Immunochemical analysis of dopamine transporter protein in Parkinson's disease*. Ann Neurol, 1997. **41**(4): p. 530-9.
65. Storch, A., et al., *1-Methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (salsolinol) is toxic to dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells via impairment of cellular energy metabolism*. Brain Res, 2000. **855**(1): p. 67-75.
66. Ishiguro, H., et al., *Enhancement of oxidative damage to cultured cells and Caenorhabditis elegans by mitochondrial electron transport inhibitors*. IUBMB Life, 2001. **51**(4): p. 263-8.
67. Das, P.C., W.K. McElroy, and R.L. Cooper, *Differential modulation of catecholamines by chlorotriazine herbicides in pheochromocytoma (PC12) cells in vitro*. Toxicol Sci, 2000. **56**(2): p. 324-31.
68. Das, P.C., W.K. McElroy, and R.L. Cooper, *Alteration of catecholamines in pheochromocytoma (PC12) cells in vitro by the metabolites of chlorotriazine herbicide*. Toxicol Sci, 2001. **59**(1): p. 127-37.