

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
JULIE BLANCHET, B.Sc. (Biologie médicale)**

**EFFET NEUROPROTECTEUR DU *TRANS-RESVÉRATROL* DANS
UN MODÈLE *IN VITRO* ET *IN VIVO* DE LA MALADIE DE
PARKINSON**

AVRIL 2006

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier ma directrice de recherche, Maria-Grazia Martinoli, pour m'avoir fait confiance et m'avoir acceptée dans son équipe.

Je veux également remercier mes collègues de travail et amis Keith Chiasson et Geneviève Bureau sans qui je n'aurais peut-être pas poursuivi mes études graduées.

Un gros merci aux étudiants des laboratoires des Drs Massicotte, Cyr et Bronchti, principalement à Stéphane Robert pour ses précieux conseils à l'animalerie. Merci à nos collaborateurs c'est-à-dire les Drs Asselin et Di Paolo et leurs équipes.

Merci aussi à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à faire de ces études un succès que ce soit par leurs encouragements et leur aide.

De plus, je ne pourrais passer sous silence mes amis : Élaine de Repentigny pour tout son support et pour avoir partagé mes « dépressions » et Cornelius pour son exemple de ténacité et sa musique. Je dois aussi une fière chandelle à ma mère pour m'avoir encouragée, écoutée et supportée tout au long de ces deux années d'études.

RÉSUMÉ

L'étiologie de la maladie de Parkinson est encore inconnue, mais l'hypothèse du stress oxydatif est bien documentée. D'autre part, diverses études ont démontré que les phyto-estrogènes, des composés naturels, font preuve d'un grand pouvoir anti-oxydant sans présenter les effets mitotiques associés à l'estradiol. Parmi ceux-ci, le *trans*-resvératrol, appartenant à la classe des flavonoïdes, a été testé *in vitro* et *in vivo* au cours de mon projet de maîtrise.

En ce qui concerne les travaux *in vitro*, le pouvoir anti-oxydant du *trans*-resvératrol a été démontré. En effet, le *trans*-resvératrol réduit jusqu'à 70% la mort cellulaire des cellules PC12 différencierées en neurones dopaminergiques lorsqu'elles sont traitées conjointement avec le MPP⁺, le métabolite actif de la toxine parkinsonienne nommée MPTP. Le *trans*-resvératrol est donc efficace pour contrer le stress oxydatif induit par le MPP⁺ et s'avère un bon neuroprotecteur.

Pour ce qui est des travaux *in vivo*, des souris de la souche C57Bl/6 ont été nourries avec une diète particulière, sans phyto-estrogène (AIN-76A), et gavées avec 0 ou 50 mg/kg de *trans*-resvératrol pendant 1 semaine pour le premier protocole. Le MPTP était injecté selon un protocole établi (10 mg/kg). Le taux de dopamine obtenu par HPLC-ED pour le groupe de souris traitée conjointement avec le *trans*-resvératrol et le MPTP est statistiquement différent de celui obtenu pour le groupe MPTP, mais similaire à celui du groupe contrôle. Ces résultats sont corroborés par l'analyse de l'intensité en fluorescence ainsi que le décompte des neurones tyrosine hydroxylase positifs, qui ont tous deux révélé des différences significatives entre les groupes *trans*-resvératrol + MPTP et MPTP seul. De plus, le dosage de l'estrogène sanguin a également été réalisé et aucune différence n'a été observée entre les groupes. Par conséquent, le *trans*-resvératrol s'avère un bon neuroprotecteur. Pour le deuxième protocole, les souris étaient gavées avec 0 ou 100 mg/kg de *trans*-resvératrol pour une période de 2 semaines. La dose de MPTP injectée était de 7 mg/kg. Le pouvoir

neuroprotecteur du *trans*-resvératrol a encore une fois été mis en évidence puisque le taux de dopamine au niveau striatal des souris traitées avec le *trans*-resvératrol et le MPTP est supérieur à celui du groupe traité avec le MPTP seulement et similaire à celui du groupe contrôle. Il en est de même pour le taux de tyrosine hydroxylase au niveau striatal. Cependant, l'homéostasie endocrine est affectée puisque le dosage de l'estrogène sanguin par EIA a révélé des différences significatives entre les groupes. Le *trans*-resvératrol demeure toutefois une molécule intéressante pour le développement d'une stratégie préventive contre la maladie de Parkinson.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	I
RÉSUMÉ.....	II
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IX
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
 1.1 Maladie de Parkinson	1
1.1.1 Introduction	1
 1.2 Diagnostic de la maladie de Parkinson	2
1.2.1 Les corps de Lewy	2
1.2.1.1 Description histologique des corps de Lewy	2
1.2.1.3 Conséquence de la présence des corps de Lewy	3
 1.3 Dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNpc dans la MP.....	4
1.3.1 Importance de la DA dans les processus du mouvement.....	5
1.3.2 Voie nigro-striée.....	5
 1.4 Les causes de la dégénérescence de la SNpc	8
1.4.1 Facteurs génétiques	8
1.4.2 Facteurs environnementaux	9
 1.5 Le stress oxydatif.....	9
1.5.1 Détoxicification cellulaire par les mécanismes enzymatiques.....	10
1.5.1.1 Mécanisme d'action de la SOD	10
1.5.1.2 Mécanisme d'action de la catalase	11
1.5.1.3 Mécanisme d'action de la glutathion peroxydase (GPase)	11
1.5.2 Implication du stress oxydatif dans MP	11
 1.6 Modèles actuels du stress oxydatif.....	13
1.6.1 Mécanisme d'action du MPTP.....	14

1.7 Traitements possibles de la maladie de Parkinson	15
1.7.1 Traitement symptomatique.....	15
1.7.1.1 La L-dopa.....	15
1.7.1.2 Les agonistes dopaminergiques	17
1.7.1.3 D'autres alternatives.....	17
1.7.2 Traitements préventifs.....	18
1.7.2.1 Les estrogènes : effets bénéfiques.....	18
1.7.2.2 Modes d'actions possibles de l'E ₂	19
1.8 Le resvératrol, un phyto-estrogène aux nombreuses propriétés	20
1.8.1 Absorption du resvératrol.....	21
1.8.2 Propriétés biologiques du resvératrol.....	21
1.9 Objectif de cette recherche.....	22
CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES	23
2.1 Travaux <i>in vitro</i>	23
2.1.1 Traitement des cellules.....	23
2.1.2 Dosage de la lactate déshydrogénase (LDH)	24
2.2 Travaux <i>in vivo</i>	25
2.2.1 Procédures expérimentales de l'expérimentation A	25
2.2.1.1 Animaux.....	25
2.2.1.2 Traitements des animaux.....	25
2.2.1.3 Dosage de la DA au niveau du striatum.....	27
2.2.1.4 Dosage de l'E ₂ sanguin	28
2.2.1.5 Immunofluorescence	29
2.2.1.6 Analyse statistique	30
2.2.2 Procédures expérimentales de l'expérimentation B	30
2.2.2.1 Animaux.....	30
2.2.2.2 Traitements des animaux.....	30
2.2.2.3 Dosage de la DA au niveau du striatum.....	30
2.2.2.4 Dosage de l'E ₂ sanguin	30
2.2.2.5 Quantification du taux de TH au niveau striatal par Western Blot	30
2.2.2.6 Analyse statistique	31
CHAPITRE III RÉSULTATS	33
3.1 Travaux <i>in vitro</i>	33
3.1.1 Neuroprotection du resvératrol et de l'E ₂ contre la toxicité du MPP ⁺ sur la lignée cellulaire PC12 différenciée.	33
3.2 Travaux <i>in vivo</i>	33
3.2.1 Résultats de l'expérimentation A.....	33
3.2.1.1 Dosage de la DA par HPLC-ED	33
3.2.1.2 Dosage de l'E ₂ sanguin	34

3.2.1.3 Immunofluorescence	36
3.2.2 Résultats de l'expérimentation B	39
3.2.2.1 Dosage de la DA au niveau du striatum.....	39
3.2.2.2 Dosage de l'E ₂ sanguin	39
3.2.2.3 Quantification du taux de TH au niveau striatal par Western Blot.....	39
CHAPITRE IV CONCLUSIONS	42
BIBLIOGRAPHIE.....	47

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1 : Concentration en resvératrol (mg/100 g poids sec), de certains vins...	21
TABLEAU 2.1 : Composition de la diète AIN-76	27
TABLEAU 2.2 : Résumé des procédures expérimentales	32

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 : Schématisation de la maladie de Parkinson	2
FIGURE 1.2 : Corps de Lewy coloré à l'ubiquitine.....	3
FIGURE 1.3 : Mise en évidence de la dégénérescence de la substance noire pars compacta chez les Parkinsoniens	4
FIGURE 1.4 : Voie nigro-striée directe (sujet sain).....	6
FIGURE 1.5 : Voie nigro-striée indirecte (sujet sain).....	7
FIGURE 1.6 : Voie nigro-striée chez le sujet Parkinsonien (hypokinétique)	8
FIGURE 1.7 : Induction de l'apoptose au niveau mitochondrial par le stress oxydatif	10
FIGURE 1.8 : Turn-over de la dopamine	12
FIGURE 1.9 : Voies d'action possible du MPP ⁺	15
FIGURE 1.10 : Synthèse de la dopamine.....	16
FIGURE 1.11 : Structure du 17 β-estradiol.....	19
FIGURE 1.12 : Structure du resvératrol.....	20
FIGURE 2.1 : Réaction de la LDH.....	24
FIGURE 3.1 : Neuroprotection du resvératrol et de l'E ₂ contre le stress oxydatif induit par le MPP ⁺ sur des cellules PC12 différenciée.	34
FIGURE 3.2 : Taux de dopamine obtenu par HPLC-ED pour des souris mâles de la souche C57Bl/6	35
FIGURE 3.3 : Taux d'E ₂ obtenus par EIA pour des souris mâles de la souche C57Bl/6.....	35
FIGURE 3.4 : A) Coupe coronale démontrant l'emplacement des coupes B)Schéma de la SNpc et de la SNpr.....	37
FIGURE 3.5 : Nombre de neurones TH positifs sur les coupes de SNpc.	38
FIGURE 3.6 : Intensité de la fluorescence obtenue pour le marquage de la TH sur des coupes de SNpc.....	38
FIGURE 3.7 : Taux de dopamine obtenus par HPLC-ED pour des souris mâles de la souche C57Bl/6.	40
FIGURE 3.8 : Taux d'E2 obtenu par EIA pour des souris mâles de la souche C57Bl/6.	40
FIGURE 3.9 : Taux de TH au niveau striatal pour des souris de la souche C57Bl/6.....	41

LISTE DES ABRÉVIATIONS

<u>Abréviations</u>	<u>Définitions</u>
6-OHDA	6-hydroxydopamine
AChE	Acétylcholinestérase
ATCC	« American Type Culture Collection »
COMT	Catéchol-O-méthyl-transférase
CTRL	Contrôle
DA	Dopamine
DAT	Transporteur de la dopamine
E ₂	17 β-estradiol
EIA	« Estrogen Immuno Assay»
FBS	« Fetal Bovine Serum »
Fe ²⁺	Fer
GP	Globus pallidus
GPase	Glutathion peroxidase
H ₂ O	Eau
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HPLC-ED	Chromatographie liquide de haute performance par détection électro-chimique
HS	« Horse Serum »
LB	Corps de Lewy
LDH	Lactate déshydrogénase
LDL	Lipoprotéines de faible densité
L-dopa	Levo-dopa
MAO-B	Monoamine oxydase B
MP	Maladie de Parkinson
MPP ⁺	«1-Methyl-4-phenylpyridinium iodide»
MPTP	«1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine hydrochloride»
NFs	Neurofilaments
NGF-7S	« Nerve Growth Factor »

NO	Oxide nitrique
O ₂	Oxygène
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
OH ⁻	Radical hydroxyl
PAF 4%	Paraformaldéhyde 4%
PB	Tampon phosphate
PBS	Tampon phosphate salin
PBS-Tx	Tampon phosphate salin supplémenté avec du Triton-x
^{Pr} AErrane	Isoflurane USP
RPMI	« Roswell Park Memorial Institute »
SDS	« Sodium dodecyl sulfate »
SNpc	Substance noire <i>pars compacta</i>
SNpr	Substance noire <i>pars reticulata</i>
SOD	Superoxide dismutase
Somnotol	Pentobarbital sodique
TH	Tyrosine hydroxylase
VMAT2	Transporteur vésiculaire des monoamines 2

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Maladie de Parkinson

1.1.1 Introduction

Décrise pour la première fois par James Parkinson en 1817, la maladie de Parkinson (MP), dont 5% des cas seulement sont d'origine génétique, se déclare généralement vers 55 ans. De plus, l'incidence de cette pathologie progressive augmente avec l'âge. En effet, de 20 à 120 personnes âgées d'environ 70 ans sur 100 000 en sont atteintes, ce qui en fait la deuxième maladie neurodégénérative en importance après la maladie d'Alzheimer [1].

Une multitude de symptômes caractérisent la MP. Parmi ceux-ci figurent le tremblement au repos et l'hypertonie plastique, c'est-à-dire une rigidité musculaire présente même à l'état passif (figure 1.1). En outre, les mouvements automatiques normaux tels qu'avaler sa salive, bouger la tête et les yeux en parlant ainsi que cligner des yeux sont déréglés chez les sujets parkinsoniens. Ces caractéristiques sont communément appelées amimie. La posture du patient est également affectée. En effet, le corps a tendance à pencher vers l'avant et l'équilibre est précaire [2] (figure 1.1).

Bien que ces signes cliniques soient présents dans la presque totalité des cas, seule la bradykinésie est indispensable au diagnostic de la MP. Cette dernière se traduit par une lenteur des mouvements ainsi qu'une difficulté à initier les mouvements. En raison de cette manifestation, il deviendra fastidieux voire même impossible au patient parkinsonien d'effectuer plus d'une tâche motrice à la fois. Par exemple, il sera incapable de s'essuyer les pieds sur un tapis d'entrée tout en parlant car il lui sera nécessaire de penser à chacun des gestes à effectuer.



FIGURE 1.1 : Schématisation de la maladie de Parkinson

1.2 Diagnostic de la maladie de Parkinson

Le diagnostic post-mortem se base sur deux critères : 1) la présence de corps de Lewy (LBs) ainsi que 2) la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* (SNpc) projetant vers le striatum [1, 2].

1.2.1 Les corps de Lewy

Le stress oxydatif ainsi que certaines mutations génétiques, dont nous discuterons plus loin, représentent deux différents facteurs pouvant causer la formation de LBs.

1.2.1.1 Description histologique des corps de Lewy

Ils sont identifiables par microscopie grâce à leur cytoplasme éosinophile de forme sphérique et sont caractérisés par un noyau dense entouré par un halo clair [3]. Généralement de forme arrondie, ils sont situés dans le périkaryon et refoulent le noyau et le pigment mélanique (figure 1.2). Le corps de Lewy est représenté par la flèche et la photo représente une coloration avec un anticorps anti-ubiquitine.



FIGURE 1.2 : Corps de Lewy.

Les différentes colorations histologiques et/ou biochimiques démontrent que leur composition est principalement protéique en forme d'agrégats. Parmi celles-ci l'on retrouve l'ubiquitine, normalement impliquée dans l'élimination des protéines endommagées. Sa présence dans les LBs pourrait donc s'expliquer par la nécessité d'éliminer les protéines altérées des neurones à la suite d'un stress cellulaire. Les neurofilaments (NFs) sont également retrouvés à l'intérieur de ces inclusions. Ceux qui s'y retrouvent sont phosphorylés, fragmentés par protéolyse et enchevêtrés pour former des filaments insolubles. En outre, ces inclusions contiennent également de l'α-synucléine, reconnue pour altérer la fonction des protéasomes et la synthèse protéique entre autre. De plus, la forme normale de cette protéine s'avère anti-apoptotique. Cependant, dans les cas de MP, cette protéine est mutée (voir section 1.4.1) [4-7].

1.2.1.3 Conséquence de la présence des corps de Lewy

Les LBs peuvent entraîner la mort neuronal d'une part en nuisant au transport dans le péricaryon et, d'autre part, en bloquant le transport axonal. En effet, ces deux événements pathologiques peuvent mener à la dégénération des axones et/ou des dendrites des neurones affectés et ainsi participer à un dérèglement des circuits neuronaux, en particulier celui reliant la SNpc au striatum [5].

1.3 Dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNpc dans la MP

Les neurones situés dans la SNpc contiennent, chez le sujet sain, de la neuromélanine leur donnant une coloration noire. Rappelons que la neuromélanine est un produit de l'oxydation de la dopamine (DA) qui s'avère un puissant chélateur de métaux dont l'ion fer (Fe^{2+}). Ce faisant, la quantité de fer augmente dans les neurones dopaminergiques de la SNpc et ce dernier peut alors interagir avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour former des radicaux hydroxyls (OH^{\cdot}) toxiques pour les neurones [8]. Ce phénomène, qui sera abordé de manière plus approfondie à la section 1.5, participe donc à la dégénérescence neuronale caractéristique de la MP. Les neurones dégénérés ne contiennent plus de DA et il n'y a donc plus de neuromélanine formée. Cette dégénérescence, chez le sujet parkinsonien, est donc visible par une diminution de la pigmentation noirâtre associée à la neuromélanine (figure 1.3). Cette dégénérescence peut également révélée par la mise en évidence de certains marqueurs tel que la tyrosine hydroxylase (TH), le précurseur de la DA.

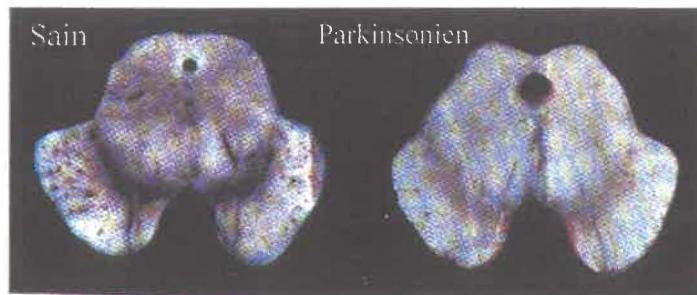


FIGURE 1.3 : Mise en évidence de la dégénérescence de la substance noire *pars compacta* chez les Parkinsoniens

1.3.1 Importance de la DA dans les processus du mouvement

Les premières observations liant la DA au mouvement ont été effectuées par un chercheur suédois nommé Ingvar Carlsson [2, 9]. Il découvrit que la réserpine, un médicament prescrit pour atténuer les délires des malades psychiatriques provoquait des raideurs musculaires chez les sujets à qui il était administré et entraînait également une rigidité catatonique chez le rat. Il se rendit compte par la suite que l'effet de la réserpine était dû à l'effondrement des concentrations de DA engendré par ce médicament. De plus, il observa que l'administration de Levo-dopa (L-dopa), précurseur biochimique de la DA, diminuait les effets de la réserpine [9].

Étant donné que la SNpc envoie des millions de terminaisons synaptiques vers le striatum (voie nigro-striée) et que le neurotransmetteur impliqué dans ce circuit est la DA, la dégénérescence des neurones de la SNpc devient l'élément déclanchant de la symptologie parkinsonienne [10].

1.3.2 Voie nigro-striée

Tel que décrit par Purves *et. al* et Zigmond *et. al* [11, 12] (figure 1.4), les neurones du caudé et du putamen sont excités de façon transitoire par ceux du cortex (projection glutamatergique). Par la suite, les neurones du caudé et du putamen projettent vers le segment interne du globus pallidus (GP) (projection GABAergique). Le neurotransmetteur relargué par les neurones du GP est également le GABA. Au repos, le complexe VA/VL est donc toujours inhibé, puisque le GP est activé de façon constitutive dans cet état. Par contre, lorsque le GP est transitoirement inhibé par le caudé et le putamen, l'inhibition pallidale sur le VA/VL est levée et le mouvement est alors facilité. De plus, la substance noire projette vers le caudé et le putamen via les récepteurs dopaminergiques. Cela a pour effet de réguler le mouvement et de permettre la précision. Cette voie est nommée voie directe (figure 1.4).

Il existe également une voie indirecte, antagoniste de la précédente, selon laquelle les neurones du segment externe du GP projettent vers le noyau sous-thalamique (également excité par le cortex). Ce dernier projette par la suite sur le segment interne du GP. Le neurotransmetteur impliqué dans cette voie est le glutamate, nous pouvons donc conclure que l'effet engendré sera une excitation des neurones inhibiteurs du GP et aura pour conséquence de renforcer l'inhibition pallidale (figure 1.5).

Dans le cas de la maladie de Parkinson, la voie unissant la substance noire au caudé et au putamen est détruite. Par conséquent, la voie reliant le noyau sous-thalamique au GP est favorisée. Étant donné que cette voie est activatrice (glutamatergique), nous pouvons conclure que l'inhibition des neurones du GP est diminuée et cela se traduit par une inhibition tonique accentuée et, par le fait même, par une excitation diminuée. Donc, la maladie serait causée par un défaut dans la désinhibition des ganglions de la base (figure 1.6) [11, 12].

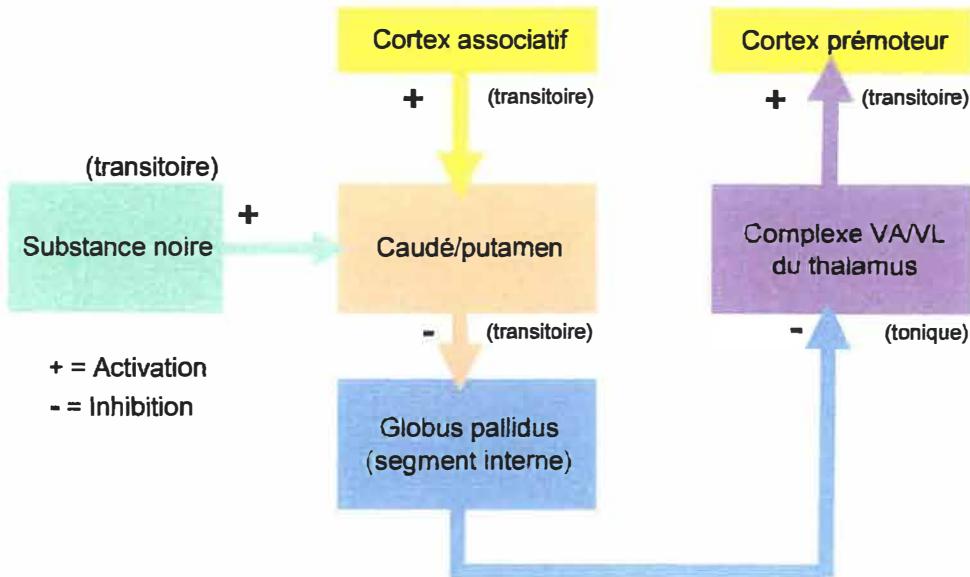


FIGURE 1.4 : Voie nigro-striée directe (sujet sain)

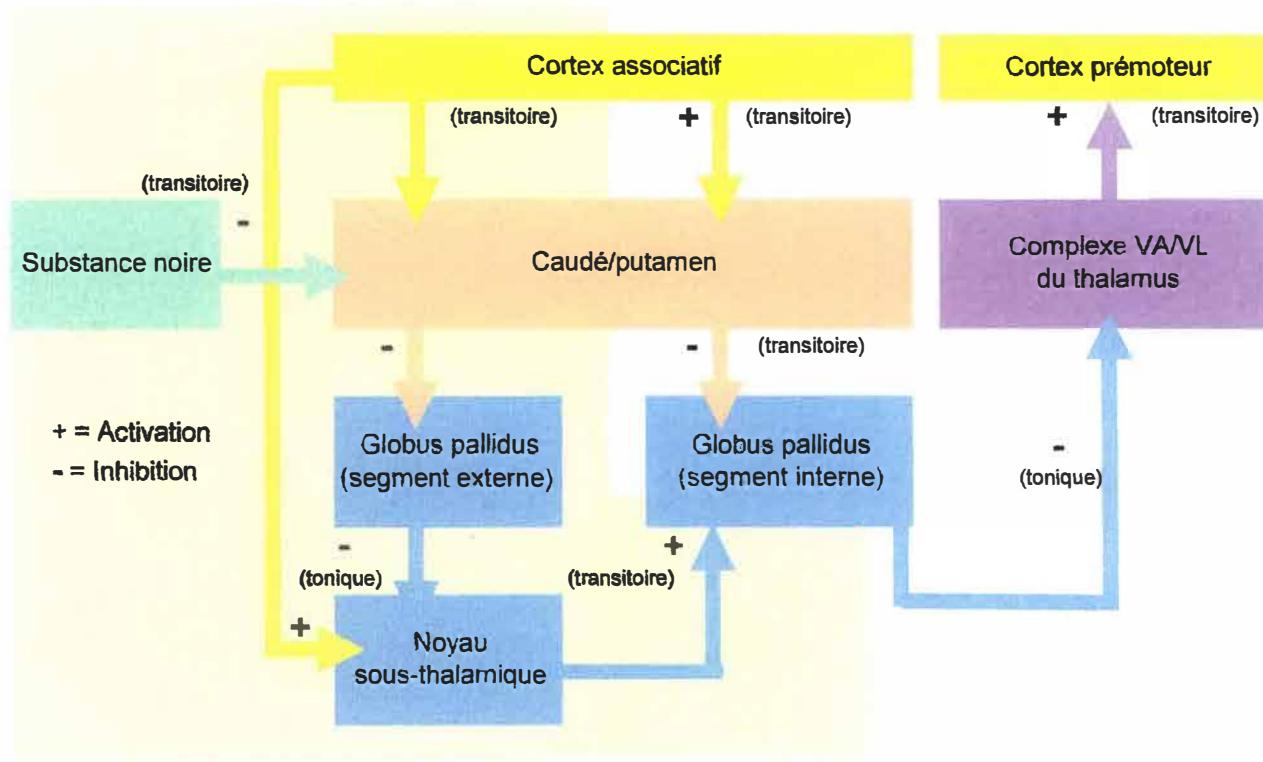


FIGURE 1.5 : Voie nigro-striée indirecte (sujet sain)

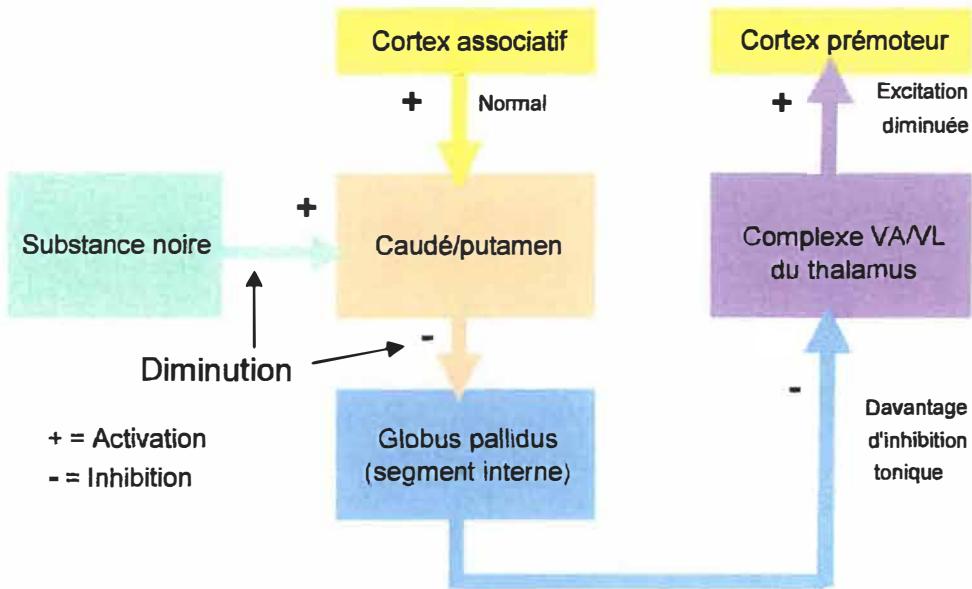


FIGURE 1.6 : Voie nigro-striée chez le sujet Parkinsonien (hypokinétique)

1.4 Les causes de la dégénérescence de la SNpc

1.4.1 Facteurs génétiques

Une petite partie des cas de MP (5%) est due à des mutations génétiques, une substitution de Ala à Thr à la position 53 (A53T) ou de Ala à Pro à la position 30 (A30P) sur le gène codant pour l' α -synucléine peut avoir de lourdes conséquences. En effet, ces mutations non sens rendent l' α -synucléine moins soluble. Cela a pour effet de favoriser l'agrégation de cette dernière avec elle-même ou d'autres protéines et, par conséquent, favoriser la formation de LBs [5, 13, 14], tel que décrit à la page 3.

D'autres mutations, par exemple au niveau du gène de la Parkin (Arg42Pro, Arg256Cys et Arg257Trp), ont quant à elles comme résultat de bloquer la E3 ubiquitine ligase [15]. Cette enzyme est responsable de l'identification des protéines dont le repliement est altéré afin de les mener vers la dégradation par les protéasomes. Ainsi, plusieurs protéines dont la structure est affectée demeurent dans le cytoplasme, ce qui contribue également à la formation des LBs [1].

1.4.2 Facteurs environnementaux

Diverses études épidémiologiques ont démontré que l'incidence de la maladie est plus élevée en milieu rural probablement en raison de l'épandage d'herbicides et de pesticides, de l'exposition aux produits chimiques agro-alimentaires ainsi qu'à la consommation d'eau de puits artésiens contaminés par ces mêmes substances [16]. Les effets indésirables reliés à ces substances semblent être dus à leur pouvoir oxydant [17], reconnu dans la littérature pour causer la MP [14, 18-22].

1.5 Le stress oxydatif

Les processus métaboliques tels que la respiration cellulaire entraînent la production de molécules extrêmement réactives et instables possédant un ou plusieurs électrons impairs nommées radicaux libres. Parmi ceux-ci nous pouvons noter l'anion superoxyde (O_2^-) et le radical hydroxyl (OH^{\cdot}). Les radicaux libres cherchent, dans le but de se stabiliser, à attaquer diverses macromolécules biologiques telles que les protéines, les acides nucléiques ainsi que les lipides membranaires de la cellule, menant ainsi à la dégénérescence de ces dernières [20].

De plus, la figure 1.7 démontre qu'au niveau mitochondrial, les radicaux libres peuvent faire changer le potentiel membranaire, ce qui a pour effet d'induire le relargage du cytochrome c. Par la suite, diverses voies de signalisation cellulaire mèneront à l'activation des caspases, puis par conséquent, à la mort cellulaire par apoptose. De plus, le relargage de cytochrome c par la mitochondrie stimule lui aussi la production de radicaux libres par cette dernière et favorise donc également la mort cellulaire [23].

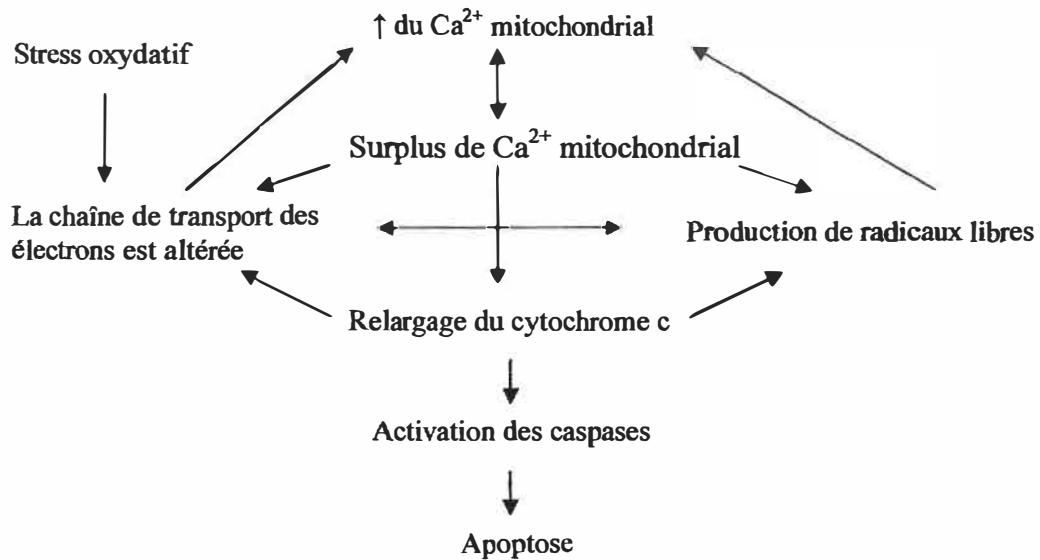


FIGURE 1.7 : Induction de l'apoptose au niveau mitochondrial par le stress oxydatif. Adapté de Fiskum *et al.*, 2003 [23].

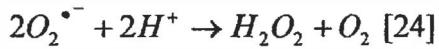
Toutefois, il faut garder à l'esprit que ces dommages ne surviennent que lorsque le taux de production des radicaux libres est supérieur au taux de dégradation de ces derniers par divers mécanismes enzymatiques [24].

1.5.1 Détoxification cellulaire par les mécanismes enzymatiques

Parmi les enzymes anti-oxydantes agissant au niveau de la détoxification cellulaire on retrouve la superoxyde dismutase (SOD), la catalase ainsi que la glutathion peroxydase (GPase).

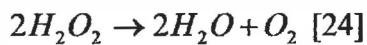
1.5.1.1 Mécanisme d'action de la SOD

Il existe deux types de SOD : la manganèse-SOD (Mn-SOD) et la fer et cuivre-SOD (Cu,Zn-SOD). La première détoxifie l' O_2^- au niveau mitochondrial tandis que la seconde s'occupe de l' O_2^- provenant d'oxydases cytosoliques et des enzymes du cytochrome P450. Toutefois, ces deux enzymes agissent selon le même mécanisme, soit en accélérant environ de 10 000 fois la vitesse de la réaction suivante :



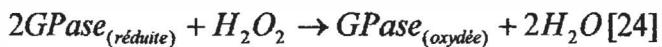
1.5.1.2 Mécanisme d'action de la catalase

La catalase est une enzyme retrouvée dans les peroxisomes et dont la fonction est de scinder les molécules de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en oxygène (O_2) selon la réaction suivante :



1.5.1.3 Mécanisme d'action de la glutathion peroxydase (GPase)

La GPase a également pour fonction de détoxifier le H_2O_2 en molécules d' H_2O selon la réaction suivante:



La GPase est localisée dans le cytosol ainsi que dans la mitochondrie, tout comme la SOD. Leur colocalisation laisse donc croire que la majeure partie du H_2O_2 formé par la réaction catalysée par la Cu,Zn-SOD au niveau cytosolique ainsi que par la Mn-SOD au niveau mitochondrial soit éliminée par la GPase [24].

1.5.2 Implication du stress oxydatif dans MP

Les radicaux libres sont présents à tous les niveaux du métabolisme cellulaire. Cependant, des études post mortem effectuées au niveau du mésencéphale de cerveau de sujet parkinsonien ont démontré que cette région est plus sujette que les autres au stress oxydatif puisqu'elle contient une grande quantité de Fe^{2+} , peu de SOD et de catalase et utilise beaucoup d' O_2 pour son métabolisme [25]. Dans le cas de la MP le turn-over de

la DA, le neurotransmetteur impliqué dans la maladie, vient entre autre s'ajouter aux mécanismes possibles du stress oxydatif (figure 1.8).

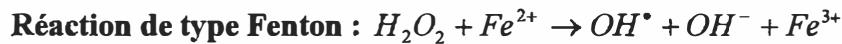
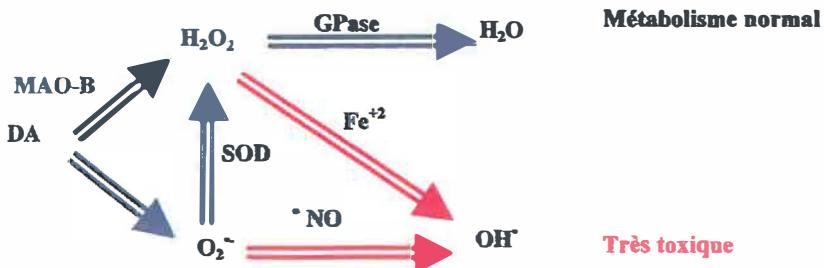


FIGURE 1.8 : Turn-over de la dopamine

En effet, le métabolisme normal de la DA par la monoamine oxydase B (MAO-B) produit du H_2O_2 qui doit ensuite être transformé en H_2O par la GPase. Cependant, la DA peut également s'auto-oxyder et entraîner la production d'un O_2^- . Ce dernier peut alors être pris en charge par la SOD qui le retransformera en H_2O_2 . Le H_2O_2 ainsi formé pourra alors être transformé en H_2O ou bien en OH^\bullet en présence de Fe^{2+} (réaction de type Fenton) [24]. Il est également possible que le O_2^- soit directement transformé en OH^\bullet à la suite de l'action de la NO synthase ('NO). Toutes ces voies sont possibles autant chez les sujets sains que chez les Parkinsoniens. Cependant, pour des raisons encore inconnues, on dénote, tel que décrit plus haut, une forte diminution de la GPase ainsi qu'une hausse considérable du taux de Fe^{2+} chez les gens atteint de la MP [25]. Par conséquent, les voies indiquées en rouge sont favorisées au détriment des autres et une forte concentration de OH^\bullet est alors générée, entraînant ainsi une augmentation du taux de mort des neurones dopaminergiques [20] .

1.6 Modèles actuels du stress oxydatif

Plusieurs modèles de la maladie de Parkinson sont connus à ce jour [14, 26-32]. Parmi ceux-ci figure, entre autre, un pesticide, la roténone [32]. Cette substance reproduit, en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire, toutes les caractéristiques de la MP c'est-à-dire la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNpc, la formation d'agrégats semblables aux LBs et des dommages oxydatifs [16]. Cependant, des recherches récentes ont mis en évidence que certains troubles moteurs rencontrés à la suite d'un traitement avec la roténone seraient attribuables à un problème de santé général plutôt qu'à un déficit moteur associé avec la MP [32].

L'administration de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) est aussi un modèle couramment utilisé [27]. La dégénérescence est ciblée au niveau des neurones dopaminergiques de la SNpc et l'action de la 6-OHDA se fait par la production de radicaux libres [19]. Cependant, la 6-OHDA ne peut traverser la barrière hémato-encéphalique et doit donc être injectée de manière stéréotaxique [27], directement dans la SNpc.

L'utilisation de l'herbicide paraquat constitue également un modèle de la MP [30, 31]. Son mode d'action repose sur l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire et donc sur la production de radicaux libres. Toutefois, sa diffusion au niveau du système nerveux central n'étant pas très spécifique [30, 31], ce modèle n'en est donc pas un à privilégier.

Dans le cadre de mon projet de recherche, le modèle retenu fût celui induit par du 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine hydrochloride (MPTP), étant donné que le métabolite actif de cette substance est le 1-methyl-4-phenylpyridinium iodide (MPP^+), le modèle *in vitro* déjà utilisé dans notre laboratoire [26]. De plus, ce modèle est bien documenté dans la littérature [28, 33].

En effet, il a été découvert dans les années 1980, à la suite de l'introduction par mégarde de MPTP dans la composition de narcotiques, que cette substance induit chez l'homme, les primates et les souris des symptômes similaires à la MP [34-37].

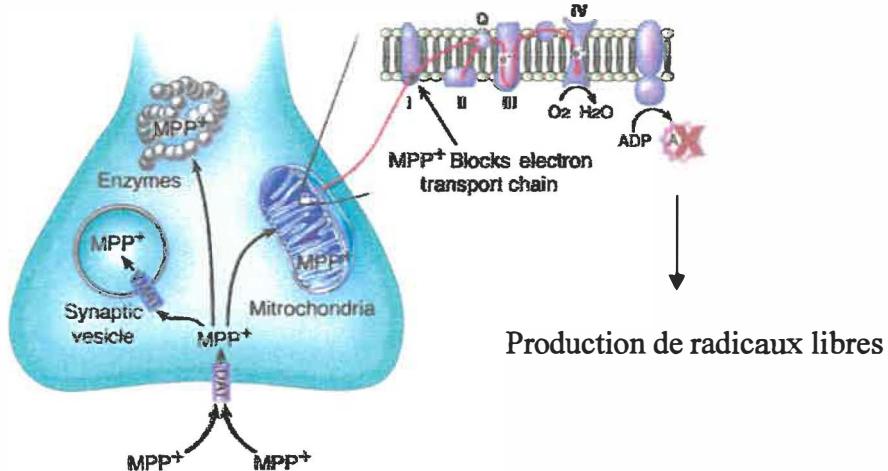
1.6.1 Mécanisme d'action du MPTP

À la suite d'une administration systémique, le MPTP, une molécule lipophile, traverse facilement la barrière hémato-encéphalique et est transformé en MPP⁺, son métabolite actif, par la MAO-B des astrocytes [38].

Puisque le MPP⁺ est une molécule polaire, elle ne peut pas traverser directement la membrane des neurones dopaminergiques. Par contre, cette toxine peut entrer dans ces neurones via le transporteur de la dopamine (DAT) [39] et il a été démontré que le blocage pharmacologique de ces transporteurs prévient la toxicité du MPP⁺ [40]. L'entrée du MPP⁺ via le DAT est donc un événement crucial dans la neurodégénérescence induite par cette substance.

Une fois à l'intérieur des neurones, le MPP⁺ peut suivre au moins 3 différents chemins (figure 1.9, adaptée de [1]). Le premier étant de demeurer dans le cytosol et d'interagir avec des enzymes (particulièrement celles portant une charge négative), ce qui s'avère毒ique pour le neurone [41]. La seconde voie repose sur le fait que le MPP⁺ peut également être internalisé dans les mitochondries et peut ainsi interférer avec la chaîne respiratoire en bloquant le complexe I et ainsi produire des radicaux libres [42]. Un troisième chemin important pouvant être emprunté par cette substance est son internalisation dans des vésicules par le transporteur vésiculaire des monoamines 2 (VMAT2). Cette internalisation permet ainsi à la cellule d'être protégée contre la toxicité du MPP⁺. Cependant, cette voie n'est pas privilégiée au niveau des neurones dopaminergiques puisque le DAT y est présent en plus grande quantité que le VMAT2, ce qui a pour conséquence de favoriser l'effet toxique du MPP⁺ [22, 40, 43-49]. Il est à noter que le MPP⁺ s'avère également un bon modèle de la MP *in vitro*. En effet, des études réalisées dans notre laboratoire ont révélé que le MPP⁺ induit la mort de cellules

neuronales PC12 (40% de mort après 24h de traitement) et que cet effet peut être contre lorsqu'les cellules sont mises en présence d'anti-oxydants 3 heures avant le début du traitement avec le MPP⁺[26].



TRADUCTIONS DES TERMES ANGLOPHONES

- « Synaptic vesicle » : Vésicules synaptiques
- « Mitochondria » : Mitochondrie
- « Enzymes » : Enzymes
- « Blocks electron transport chain » : Blocage la chaîne de transport des électrons

FIGURE 1.9 : Voies d'action possible du MPP⁺. Adaptée de Dauer *et.al.* [1]

1.7 Traitements possibles de la maladie de Parkinson

1.7.1 Traitement symptomatique

1.7.1.1 La L-dopa

La MP est due à la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNpc et, par conséquent, à un déficit en DA. Une source exogène de DA s'avérera donc prometteuse pour contrer les symptômes de la maladie. Selon la chaîne de synthèse de

la DA représentée à la figure 1.10, nous pouvons voir que la TH transforme la tyrosine en L-dopa, pouvant traverser la barrière hémato-encéphalique. Cependant, cette étape de la synthèse n'est pas une bonne cible pharmaceutique puisque la TH fonctionne lentement et que la tyrosine non utilisée est détruite. Par la suite, la dopa décarboxylase transforme la L-dopa en DA. Cependant, la DA ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique. Cela pourrait donc laisser présumer que la DA ne pourra entraîner d'effet bénéfique au niveau cérébral. Toutefois, cette étape demeure une bonne cible pharmacologique puisqu'un inhibiteur de la dopa décarboxylase peut être ajouté à la L-dopathérapie. Par conséquent, il y aura moins de DA formé à partir de la L-dopa et une plus grande quantité de cette dernière sera disponible au niveau du cerveau pour être ensuite converti en DA. Ainsi, la concentration en DA augmente au niveau cérébral et les symptômes de la MP, décrits à la page 1, sont alors diminués considérablement après deux à trois mois de médication avec la L-dopa.

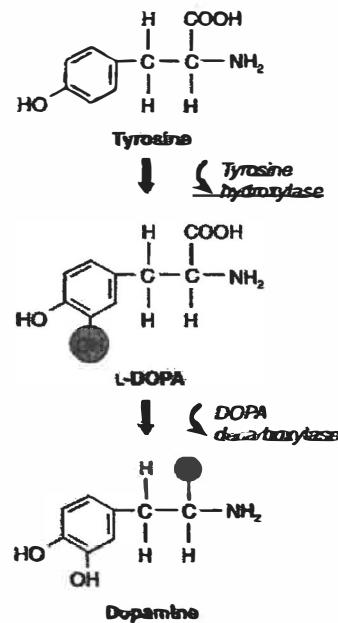


FIGURE 1.10 : Synthèse de la dopamine

Cependant, après quelques années, les patients traités avec la L-dopa développent des mouvements involontaires, nommés dyskinésie, qui sont difficiles à contrôler avec des médicaments et qui réduisent la qualité de vie de ces patients [50]. De plus, l'effet de la L-dopa sur les symptômes de la MP n'est pas stable. En effet, des fluctuations entre l'état de bien-être, c'est-à-dire sans symptômes et le retour de ces derniers, sont de plus en plus fréquentes, c'est l'effet «on-off» [2].

1.7.1.2 Les agonistes dopaminergiques

Les agonistes dopaminergiques miment l'effet de la DA. Ils ont pour avantage d'avoir une plus longue durée d'action que la L-dopa ainsi que de ne pas nécessiter la conversion de dopa en DA. Cependant, ils n'agissent généralement pas sur un type spécifique de récepteurs dopaminergiques. Par exemple, le pramipexole est un agoniste D₂/D₃ très utilisé. De plus, leur effet est moins prononcé que celui de la L-dopa. C'est pourquoi le traitement médical actuel repose souvent sur une bithérapie (L-dopa + agoniste dopaminergique). Cette bithérapie permet aussi de diminuer la dose de L-dopa administrée et diminue ainsi les dyskinésies induites par la L-dopa.

Lorsqu'ils sont administrés seuls, les agonistes dopaminergiques n'entraînent pas les dyskinésies associées à la L-dopa. Cependant, les doses nécessaires pour obtenir un bénéfice au niveau symptomatique sont généralement assez élevées, ce qui peut provoquer chez le patient des hallucinations visuelles et auditives [2].

1.7.1.3 D'autres alternatives

Les inhibiteurs de la MAO ainsi que de la catéchol-O-méthyl-transférase (COMT), s'avèrent de bons médicaments d'appoints. En effet, ces substances empêchent la dégradation de la DA par ces enzymes, diminuant ainsi la déplétion dopaminergique [2].

1.7.2 Traitements préventifs

Les thérapies présentées dans la section précédente sont efficaces, certes, mais, comme leur nom l'indique, elles ne font que soulager les symptômes. Il est donc logique de se tourner également vers une voie préventive. En effet, le scénario idéal serait de contrecarrer la dégénérescence neuronale, mais la recherche d'un traitement permettant de ralentir cette perte neuronale s'avère très prometteuse pour les décennies à venir.

Dans le cadre de mon projet de recherche, je me suis tournée vers la thérapie estrogénique comme thérapie complémentaire aux thérapies pharmacologiques. Je vous expliquerai d'abord les effets et les mécanismes sous-tendus par le 17β -estradiol (E_2), puis j'élaborerai davantage sur les phyto-estrogènes, plus particulièrement le *trans*-resvératrol (ultérieurement nommé resvératrol).

1.7.2.1 Les estrogènes : effets bénéfiques

L' E_2 est maintenant reconnu comme étant une molécule nécessaire au maintien de l'intégrité des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée. En effet, une étude menée par Leranth *et al.* a démontré qu'une diminution du taux d' E_2 pendant trente jours est suffisante pour engendrer une perte neuronale dopaminergique permanente de plus de 30% [51].

L'effet bénéfique de l' E_2 a également été démontré au niveau de la maladie d'Alzheimer. En effet, l' E_2 fait augmenter le taux d'acétylcholine, le neurotransmetteur qui fait défaut dans cette pathologie, tout en réduisant la production des protéines précurseures de la β -amyloïde, connue pour s'agréger en plaques. [52].

En outre, diverses études ont mis en évidence les effets neuroprotecteurs bénéfiques de l' E_2 *in vitro* [53, 54]. De plus, des travaux réalisés dans notre laboratoire

ont démontré que l'E₂ réduit d'environ 53% la mort cellulaire induite par le MPP⁺ en utilisant des neurones en cultures [26].

L'efficacité de l'E₂ a aussi été démontrée *in vivo* sur un modèle de la MP. En effet, des souris traitées avec de l'E₂ pour une certaine période et ensuite injectées avec du MPTP (10-15 mg/kg) ont présenté des taux de dopamine similaires aux souris du groupe contrôle [55, 56].

1.7.2.2 Modes d'actions possibles de l'E₂

Le pouvoir anti-oxydant de l'E₂ serait dû à la présence d'un groupement hydroxyl sur le carbone 3 de l'anneau A (figure 1.11) [54]. En effet, l'atome d'hydrogène situé sur ce groupe phénolique peut être donné. Par conséquent, les radicaux libres présents dans le milieu seront stabilisés et donc neutralisés par cet échange [52].

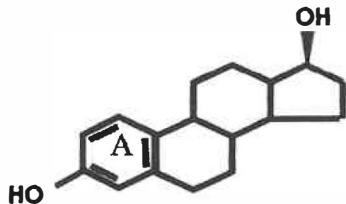


FIGURE 1.11 : Structure du 17 β-estradiol

L'E₂ est également reconnu entre autre pour bloquer le DAT. Ainsi, l'E₂ prévient la mort neuronale induite par le MPTP en empêchant l'internalisation du MPP⁺, son métabolite actif, dans les neurones dopaminergiques [56-58].

L'E₂ peut également se lier au niveau de son récepteur nucléaire et activer la transcription de molécules anti-apoptotiques ou du cytosquelette, favorisant ainsi la neuroprotection et la régénérescence axonale. De plus, l'E₂ peut moduler l'expression de récepteurs pour les facteurs de croissance [53, 59, 60] tel que le NGF.

La connaissance des mécanismes d'actions de l'E₂ ainsi que les résultats encourageants obtenus à ce jour font de cette molécule un élément thérapeutique à considérer. Cependant, il faut garder à l'esprit que l'E₂ est aussi reconnu pour avoir un fort effet mitotique [61]. De plus, les doses nécessaires pour l'obtention des bénéfices engendrés par l'E₂ sont assez élevées, ce qui a pour conséquence de favoriser le développement de cancers hormono-dépendant tels que le cancer de l'utérus et du sein [62, 63].

1.8 Le resvératrol, un phyto-estrogène aux nombreuses propriétés

Les phyto-estrogènes sont des composés dérivés de plantes possédant une structure similaire à l'E₂. Divisés en trois classes (flavonoides, coumestans et lignans), ces composés présentent des propriétés estrogéniques et anti-estrogéniques en se liant aux récepteurs estrogéniques. Cependant, dans le cas du resvératrol (Figure 1.12), cette liaison est de l'ordre de 7 000 fois plus faible que celle de l'E₂ sur ce même récepteur [64]. Par conséquent, aucun effet mitotique n'a été mis en évidence pour ce phyto-estrogène jusqu'à maintenant. De plus, l'intérêt porté à cette molécule est d'autant plus marqué dû au fait qu'il est retrouvé dans l'alimentation notamment dans les raisins et le vin rouge (0,1-15 mg/mL) [65]. Le tableau 1.1 révèle la concentration en resvératrol de quelques vins. Notons que le vin blanc en contient moins puisque le resvératrol est contenu principalement dans la pelure du raisin rouge.

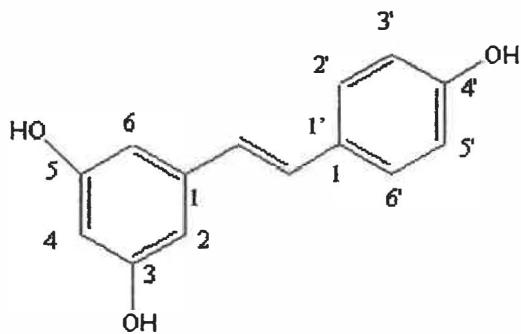


FIGURE 1.12 : Structure du resvératrol

1.8.1 Absorption du resvératrol

Présent sous forme glycosylée dans le raisin, le resvératrol doit subir quelques transformations avant de pouvoir être absorbé au niveau du petit intestin. En effet, le resvératrol doit d'abord être déglycosylé par la β -déglycosylase, puis ensuite glucuronidé afin de traverser la paroi intestinale, puisque la forme déglycosylée n'est pas très liphophile et traverse donc moins bien la paroi. Une sulfation du resvératrol est également possible pour favoriser l'absorption du resvératrol [66-70].

Bertelli *et al.* ont démontré que le resvératrol entre rapidement dans la circulation sanguine et qu'une concentration considérable est retrouvée dans le plasma et différents organes [71]. D'autres études ont quant à elles mis en évidence qu'une consommation moyenne de vin rouge peut, à long terme, s'avérer suffisante pour obtenir des résultats bénéfiques sur la santé [64, 65, 71-73]. De plus, il est intéressant de noter qu'une fois que la concentration de resvératrol nécessaire est atteinte, un équilibre se crée entre la quantité absorbée et la quantité éliminée [71].

TABLEAU 1.1 : Concentration en resvératrol (mg/100 g poids sec), de certains vins.

Vins	Concentration en resvératrol (mg/100 g poids sec)
Chardonnay blanc (France)	196,0
Chardonnay blanc (Italie)	152,2
Cabernet Sauvignon rouge (France)	760,0
Chianti réserve rouge (Italie)	1378,0

Tiré de Mazur W., 1998 [74]

1.8.2 Propriétés biologiques du resvératrol

Le resvératrol possède de nombreuses propriétés biologiques parmi lesquelles figurent l'inhibition de l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL),

l'agrégation plaquettaire ainsi qu'un pouvoir anticancéreux [75-80]. De plus, le resvératrol est également reconnu pour être un très bon neuroprotecteur. En effet, des études déjà menées dans notre laboratoire ont démontré que le resvératrol réduit jusqu'à 70% la mort neuronale induite par la toxine MPP⁺ [26].

1.9 Objectif de cette recherche

Malgré la quantité considérable d'articles publiés sur les propriétés biologiques du resvératrol, très peu d'informations sont disponibles à ce jour concernant les effets de cette substance au niveau cérébral. Basée sur la capacité du resvératrol à agir en tant qu'anti-oxydant ainsi que sur les résultats *in vitro* concluants obtenus par notre équipe auparavant, mon projet de maîtrise visait à déterminer l'effet du resvératrol sur la mort neuronale dopaminergique de la SNpc engendrée par le MPTP. Mes études se sont fait *in vivo* en utilisant des souris de la souche C57Bl/6, et, en partie, *in vitro*. Mes objectifs de recherche étaient donc :

- 1) Confirmer les travaux *in vitro* sur la lignée cellulaire PC12, indiquant que le resvératrol protège les cellules de la mort induite par le MPP⁺.
- 2) Mettre au point un modèle *in vivo* d'administration du resvératrol par voie orale.
- 3) Vérifier que le resvératrol ne modifie pas les niveaux systémiques d'hormones circulantes telle que l'E₂.
- 4) Vérifier si le resvératrol, par voie orale, peut réduire la mort des neurones dopaminergiques induite par le MPTP, et module les taux de TH, marqueur de la DA.

En conclusion, mes travaux de maîtrise ont porté sur l'effet neuroprotecteur du resvératrol.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Travaux *in vitro*

La capacité du resvératrol à contrer la mort cellulaire induite par le MPP⁺ a été évaluée sur la lignée cellulaire de phéochromocytome de rat (PC12, ATCC, États-Unis). Les cellules étaient cultivées dans un milieu RPMI 1640 (Sigma Aldrich, Canada) supplémenté de 5% de sérum bovin fœtal (FBS, Gibco, Canada) et de 10% de sérum de cheval (HS, Gibco, Canada) et maintenues dans un environnement à 37°C et 5% d'humidité.

2.1.1 Traitement des cellules

Par la suite, les cellules ont été ensemencées dans des plaques de 96 trous (VWR international, Canada). Du facteur de croissance du nerf (NGF-7S, Sigma Aldrich, Canada) était ajouté dans le milieu RPMI 1640 (1% de FBS) pour induire la différenciation des cellules en neurones, pour une période de 12 jours. Le milieu était alors remplacé par un milieu RPMI 1640 supplémenté de 1% de FBS stripé, c'est-à-dire sans estrogènes, pendant deux jours. Ensuite, le milieu était changé par du milieu identique ou supplémenté avec du resvératrol (10^{-7} M) ou de l'E₂ (10^{-7} M), puis le MPP⁺ (0,3 mM) était ajouté à ce milieu trois heures plus tard pour une période de 24 heures. Il est à noter que pour chaque expérimentation, un contrôle de mort minimale ainsi qu'un contrôle de mort maximale, nommés « low control » et « high control » respectivement, étaient réalisés afin de mesurer le pourcentage de mort minimal et maximal de chaque expérimentation. Dans le cas du « low control », les cellules étaient laissées dans le milieu RPMI 1640 supplémenté de 1% de FBS stripé, tandis que le « high control » consistait à ajouter du Triton-X dans le milieu afin de faire éclater les membranes cellulaires.

2.1.2 Dosage de la lactate déshydrogénase (LDH)

La LDH est relarguée dans le milieu lors de la mort cellulaire. Selon les instructions du kit de dosage de la LDH (kit # 1 644 793, Roche Diagnostique, Allemagne), le taux de LDH mesuré dans le milieu est proportionnel à cette mort. Par conséquent, le dosage de la LDH s'avère un bon moyen de mesurer la mort cellulaire induite par le MPP⁺.

Durant la première étape de ce test, la LDH réduit le NADH⁺ en NADH/H⁺ par l'oxydation du lactate en pyruvate. Par la suite, un catalyseur transfère H/H⁺ du NADH + H⁺ au sel de tétrazolium (jaune pâle) qui est alors réduit en sel de formazan. Ce dernier est de couleur rougeâtre et son absorbance est mesurée à 490 nm (figure 2.1).

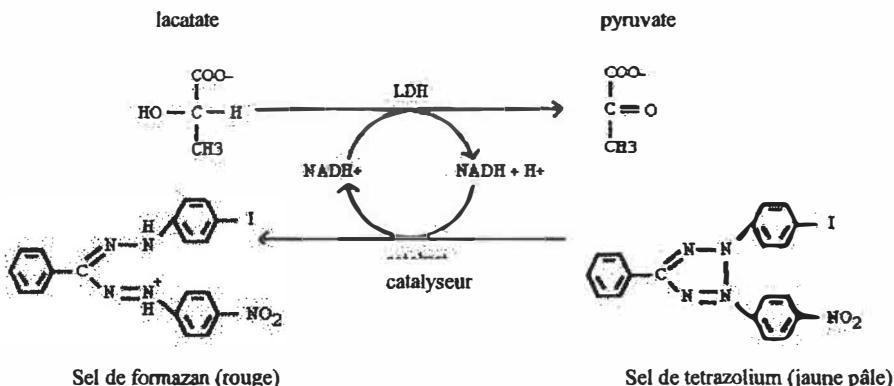


FIGURE 2.1 : Réaction de la LDH

Le calcul du pourcentage de mort cellulaire se fait comme suit :

$$\% \text{ de mort cellulaire} = \left(\frac{\text{valeur expérimentale} - \text{valeur du « low control »}}{\text{valeur du « high control »} - \text{valeur du « low control »}} \right) \times 100$$

Canada) à raison de quatre injections de 10 mg/kg au 2 heures. Le sacrifice a eu lieu 5 jours plus tard par a) perfusion ou par b) guillotine.

a) Méthodologie pour la perfusion et conservation des tissus obtenus

Les souris étaient anesthésiées par injection avec du pentobarbital sodique 65 mg/mL (Somnotol) (CDMV, Canada). Une ouverture au niveau de la cage thoracique était pratiquée afin de pouvoir faire une incision au niveau de l'oreille droite et de l'apex cardiaque. Une solution de tampon phosphate salin (PBS) 0,1M était injectée au niveau de l'apex afin de rincer les tissus, puis cette solution était remplacée par une solution de paraformaldéhyde 4% (PAF 4%) (Sigma Aldrich, Canada), ce qui entraîne la fixation des tissus.

Les cerveaux de ces souris étaient ensuite extraits et post-fixés dans une solution de PAF 4% durant quatre à six heures, puis placés dans une solution de sucre 10%, un cryoprotectant, avant d'être immergés dans l'isopentane (Sigma Aldrich, Canada) à -80°C, puis congelés à la même température pour la conservation.

b) Méthodologie pour la guillotine et conservation des tissus obtenus

Les souris étaient anesthésiées par asphyxie dans un atmosphère d'isoflurane USP (PrAEthane) (CDMV, Canada) avant d'être guillotinées. Les cerveaux étaient rapidement extraits, plongés dans l'isopentane à -80°C, puis congelés à la même température pour la conservation.

Il est à noter qu'un échantillon sanguin a été prélevé chez ces souris.

TABLEAU 2.1 : Composition de la diète AIN-76

a) FORMULE		
Contenu	%poids (g)	kcal%
Protéines	20,3	20,8
Hydrates de carbone	66,0	67,7
Gras	5,0	11,5
Total	91,3	100,0

b) INGRÉDIENTS		
Contenu	Poids (g)	kcal
Caséine (30 mesh)	100	800
DL-methionine	3	12
Fécule de maïs	150	600
Sucrose	500	2000
Cellulose BV200	50	0
Huile de maïs	50	450
Mélange minéral S10001	35	0
Mélange vitamines V10001	10	40
Bitartrate de choline	2	0
Total	1000	3902

kcal/g = 390

2.2.1.3 Dosage de la DA au niveau du striatum

Un hémisphère de chaque cerveau obtenu par guillotine a été utilisé pour faire le dosage par chromatographie liquide de haute performance avec détection électrochimique « High Performance Liquid Chromatography by Electrochemical Detection » (HPLC-ED). Les striatums ont été extraits selon les coordonnées stéréotaxiques de l'atlas de Franklin et Paxinos (1997). Par la suite, ils ont été dissous dans 250 µL de HClO₄ 0,1 N et centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes. Les surnageants ont été directement injectés dans le chromatographe composé d'un injecteur automatique Waters 717, d'une pompe 515 équipée d'une colonne Beckman C-18 (Ultrasphere ODS, 5 µm, 4,6 mm X 25 cm), d'un détecteur électrochimique BAS LC-4C ainsi que d'une électrode de carbone. La phase mobile était composée d'acide citrique 0,025 M, d'acide 1-heptane-sulfonique 1,7 mM, de méthanol 10% ainsi que d'eau

distillée filtrée et était libérée à une vitesse de 1 mL/min. Le potentiel électrochimique était réglé à 0,8V en référence avec une électrode Ag/AgCl.

Cette expérimentation a été effectuée en collaboration avec l'équipe du Dr Di Paolo de l'Université Laval.

2.2.1.4 Dosage de l'E₂ sanguin

Les échantillons sanguins ont été incubés à 37°C pour une période de 1 heure afin de favoriser la coagulation, puis centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes. Les surnageants étaient utilisés pour le dosage par EIA (« Estrogen Immuno Assay ») à l'aide du kit numéro 582251 (Cayman Chemical, obtenu via Cedarlane, Hornby, Canada).

Brièvement, ce test repose sur la compétition entre l'E₂ « libre », c'est-à-dire l'E₂ de l'échantillon à doser, et un traceur [E₂ lié à l'acétylcholinestérase (AChE)]. La quantité de traceur pouvant se lier à un antisérum de lapin est inversement proportionnelle à la quantité d'E₂ libre puisque la quantité de traceur est conservée constante. De plus, les complexes formés soit de traceur et d'antisérum ou d'E₂ et d'antisérum peuvent se lier à l'anticorps adsorbé au fond des puits des plaques. Par la suite, les plaques sont lavées avec un tampon et le réactif de Ellman's, contenant le substrat pour l'AChE, est ajouté dans les puits. Cette réaction enzymatique entraîne l'apparition d'une coloration jaune absorbée à 412 nm. Par conséquent, l'intensité de cette couleur, dosée par spectrophotométrie, est proportionnelle à la quantité de traceur attaché à chaque puit et donc inversement proportionnelle à la quantité d'E₂ contenue dans l'échantillon.

Cette expérimentation a été faite en collaboration avec l'équipe du Dr Asselin à l'Université du Québec à Trois-Rivières.

2.2.1.5 *Immunofluorescence*

Les cerveaux obtenus à la suite d'une perfusion ont été coupés en sections de 40 µm à l'aide d'un microtome à congélation. Les sections de la SNpc, ont été plongées dans du tampon phosphate (PB) 0,01M pendant 10 minutes à deux reprises, puis immergées à quatre reprises dans un bain de PBS à pH 7,4 contenant 0,3% de Triton-X (PBS-Tx) pendant 15 minutes afin de favoriser la perméabilisation des membranes. Les sites non spécifiques ont été bloqués avec du sérum normal de chèvre 10% (dans du PBS-Tx) pendant 2 heures à la température de la pièce. Les sections étaient ensuite incubées durant 24 heures dans une solution d'anticorps primaire dirigés contre la TH (Sigma Aldrich, Canada) dilué 1 :250 dans du sérum normal de chèvre 10% dans du PBS-Tx. La TH est l'enzyme précurseur de la DA (voir section 1.7.1.1 à la page 15) et elle est couramment utilisée pour détecter la présence de DA. L'anticorps secondaire lié à un fluorophore, le Cy3 (λ Ex : 552 nm, λ Em : 565 nm) (Jackson ImmunoResearch, États-Unis), a été dilué 1 :100 dans la même solution que l'anticorps primaire et l'incubation durait 1 heure. À la suite de quatre lavages de 15 minutes dans du PBS-Tx, les coupes étaient rincées dans du PB, puis immédiatement montées sur lames gélatinées. Les lames étaient laissées à la noirceur et à la température de la pièce pour y faire adhérer les coupes pendant une nuit, puis elles étaient montées avec une lamelle à l'aide d'Eukitt (Sigma Aldrich, Canada).

Le décompte des neurones TH positifs a été réalisé en ajustant le contraste des photos dans le logiciel Photoshop afin de favoriser la distinction des neurones du bruit de fond. Par la suite, les photos étaient transférées dans le logiciel Quantity One, d'où il était plus facile de diviser la photo en plusieurs parties pour faire le décompte.

L'analyse de l'intensité a, quant à elle, été effectuée grâce au logiciel Quantity One (Bio-Rad, Mississauga, Ontario).

2.2.1.6 Analyse statistique

L'analyse statistique des données a été réalisée grâce au logiciel GraphPad InStat à l'aide du test de Dunnet's. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SEM et les chiffres dans les colonnes des graphiques représentent le nombre d'animaux par groupe.

2.2.2 Procédures expérimentales de l'expérimentation B

2.2.2.1 Animaux

Idem à la section 2.2.1.1.

2.2.2.2 Traitements des animaux

La dose de resvératrol était dans ce cas-ci de 100 mg/kg et celle de MPTP de 7 mg/kg. Le MPTP était injecté au 14^e jour après le début de la diète.

2.2.2.3 Dosage de la DA au niveau du striatum

Idem à la section 2.2.1.3

2.2.2.4 Dosage de l'E₂ sanguin

Idem à la section 2.2.1.4

2.2.2.5 Quantification du taux de TH au niveau striatal par Western Blot

Les protéines des cerveaux obtenus par guillotine ont été extraites avec du tampon de lyse et dosées par la méthode de Lowry.

Une quantité égale de protéines a été ajoutée dans les puits d'un gel d'acrylamide contenant 10% de sodium dodécyl sulfate (SDS) (Sigma Aldrich, Canada). L'électrophorèse se faisait pendant 45 minutes sous un voltage de 200V. Les protéines étaient ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad Laboratories Canada Ltd, Canada) pendant 1h30 sous un voltage de 60V. Les membranes étaient ensuite plongées dans une solution de lait 5% diluée dans du PBS 0,01M (PBS-lait) afin de bloquer les sites non spécifiques pendant 1 h à température de la pièce, puis elles étaient incubées dans une solution d'anticorps primaire dirigé contre la TH (Sigma Aldrich, Canada) dilué 1 :500 dans une solution de PBS-lait 1% pendant une nuit. Ces dernières étaient alors lavées dans du PBS puis incubées avec un anticorps secondaire conjugué avec une peroxidase (dilution 1 :10 000) (Sigma Aldrich, Canada) pendant 1 h. La révélation était réalisée en utilisant du SuperSignal West Femto (MJS Biolynx Inc., Canada) et le système d'imagerie ChemII Dark Room (VWR international, Canada).

2.2.2.6 Analyse statistique

L'analyse de l'intensité des bandes obtenues par Western Blot a été faite à l'aide du logiciel Quantity One. L'analyse statistique des résultats a été effectuée avec le logiciel GraphPad Instat (test de Dunnett's). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM et les chiffres indiqués dans les colonnes des graphiques représentent le nombre d'animaux par groupe.

Un résumé des procédures expérimentales est fait dans le tableau 2.2.

TABLEAU 2.2 : Résumé des procédures expérimentales

Expérimentation	Dîète	Durée	Dose de MPTP	Méthodes utilisées
A	AIN-76 + 0 ou 50 mg/kg de resvératrol	1 semaine	4 injections de 10 mg/kg	HPLC-ED, EIA, immunofluorescence
B	AIN-76 + 0 ou 100 mg/kg de resvératrol	2 semaines	4 injections de 7 mg/kg	HPLC-ED, EIA, Western Blot

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Travaux *in vitro*

3.1.1 Neuroprotection du resvératrol et de l'E₂ contre la toxicité du MPP⁺ sur la lignée cellulaire PC12 différenciée.

Le MPP⁺ (0,03 mM) seul induit un pourcentage de mort cellulaire d'environ 30%. Dans le cas des cellules traitées avec le MPP⁺ conjointement au resvératrol (10^{-7} M), une forte diminution du taux de mort cellulaire (21%) est observée ($p < 0,01$ vs MPP⁺). Pour ce qui est de celles traitées avec le MPP⁺ et l'E₂ (10^{-7} M), on dénote également une diminution significative du taux de mort cellulaire de l'ordre de 16% ($p < 0,05$ vs MPP⁺). Il est à noter que le resvératrol seul et l'E₂ seul n'induisent pas de mort cellulaire. De plus, l'E₂ est utilisé ici comme contrôle interne puisqu'il est un neuroprotecteur déjà utilisé dans notre laboratoire. Le resvératrol et l'E₂ étaient ajoutés au milieu de culture 3 heures avant l'ajout de MPP⁺. Le temps d'incubation avec ce dernier était de 24 heures. Ces résultats sont la moyenne de trois expérimentations et sont schématisés à la figure 3.1.

3.2 Travaux *in vivo*

3.2.1 Résultats de l'expérimentation A

3.2.1.1 Dosage de la DA par HPLC-ED

Le dosage du taux de dopamine par HPLC-ED, représenté à la figure 3.2, a révélé que le groupe contrôle (CTRL), c'est-à-dire ayant reçu la diète AIN-76 seule, et le groupe resvératrol 1 semaine ont résultés en des taux de dopamine similaires. Pour ce qui est du groupe ayant reçu les injections de MPTP (groupe MPTP pour les figures),

une déplétion significative de l'ordre de 67% du taux de dopamine par rapport au groupe CTRL a été observée ($p < 0.01$). De plus, il faut noter que la petite déplétion dopaminergique (8%) obtenue pour le groupe resvératrol 1 semaine + MPTP est beaucoup moindre que celle obtenue pour le groupe MPTP. Ces résultats sont exprimés en pourcentage de contrôle à la figure 3.2. Les chiffres indiqués à l'intérieur des colonnes représentent le nombre d'animaux de chaque groupe.

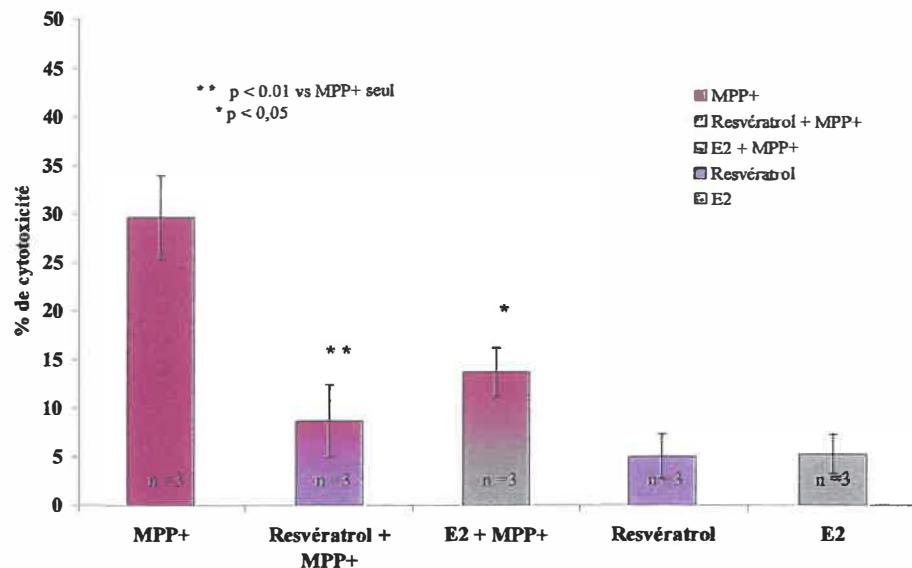


FIGURE 3.1 : Neuroprotection du resvératrol et de l'E₂ contre le stress oxydatif induit par le MPP⁺ sur des cellules PC12 différenciée.

3.2.1.2 Dosage de l'E₂ sanguin

Les résultats obtenus pour le dosage des estrogènes sanguins par EIA sont représentés à la figure 3.3. Comme le démontre ce graphique, il n'y a aucune différence significative entre les concentrations d'E₂ sanguins entre les groupes.

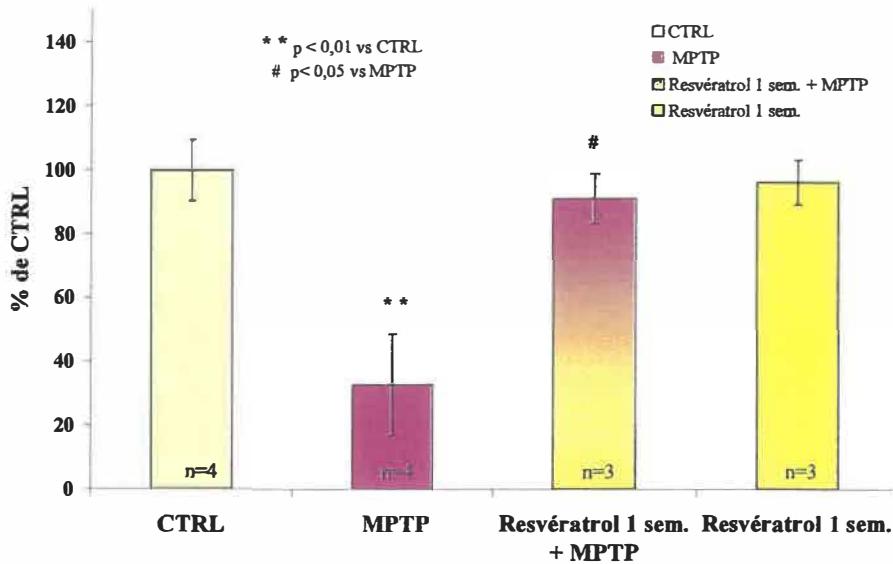


FIGURE 3.2 : Taux de dopamine obtenu par HPLC-ED pour des souris mâles de la souche C57Bl/6

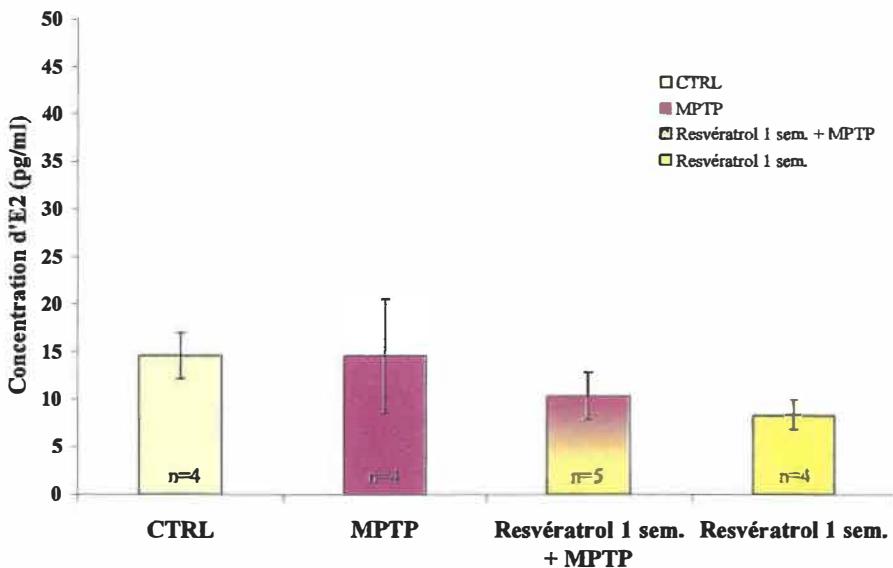


FIGURE 3.3 : Concentrations d'E₂ obtenus par EIA pour des souris mâles de la souche C57Bl/6.

3.2.1.3 Immunofluorescence

Cette section sera divisée en trois sous-sections : a) photos des coupes, b) décompte des neurones TH positifs et c) intensité de la fluorescence.

a) Photos des coupes

La figure 3.4 A) représente un schéma de la SNpc, de la substance noire *pars reticulata* (SNpr) et des structures avoisinantes. La figure 3.4 B) présente la meilleure photo obtenue pour chacune des conditions expérimentales. L’agrandissement est de 10x et le temps d’exposition est de 30 ms. Les coupes ont été choisies au niveau de la SNpc à l’aide de l’atlas de Franklin et Paxinos (2001) (Bregma -3,16 à -3,52 mm).

b) Décompte des neurones TH positifs

Le décompte des neurones TH positifs a révélé que le nombre de neurones du groupe MPTP est fortement réduit (53%) comparativement au groupe CTRL ($p < 0.01$). Les nombres de neurones TH positifs retrouvés chez les groupes resvératrol 1 semaine et resvératrol + MPTP sont quant à eux similaires à celui du groupe CTRL mais diffère du groupe MPTP ($p < 0.01$ et $p < 0.05$ respectivement). Par conséquent, le resvératrol agit en protégeant la viabilité des neurones. Ces résultats sont présentés à la figure 3.5 et sont exprimés en pourcentage de contrôle. Les chiffres indiqués dans les colonnes représentent le nombre de coupes utilisées.

c) Intensité de la fluorescence

Les résultats de la figure 3.6 démontrent que l’intensité de la fluorescence pour le groupe MPTP est fortement réduite (77%) comparativement au groupe CTRL. L’intensité des groupes resvératrol 1 semaine et resvératrol 1 semaine + MPTP est similaire à celle du groupe CTRL. Il est à notre que la neuroprotection du resvératrol ayant été démontrée à la section précédente, ces résultats ne peuvent donc être reliés à

une modulation à la hausse du taux de TH. Les résultats sont exprimés en pourcentage de contrôle. Les chiffres dans les colonnes représentent le nombre de photos utilisées pour faire l'analyse.

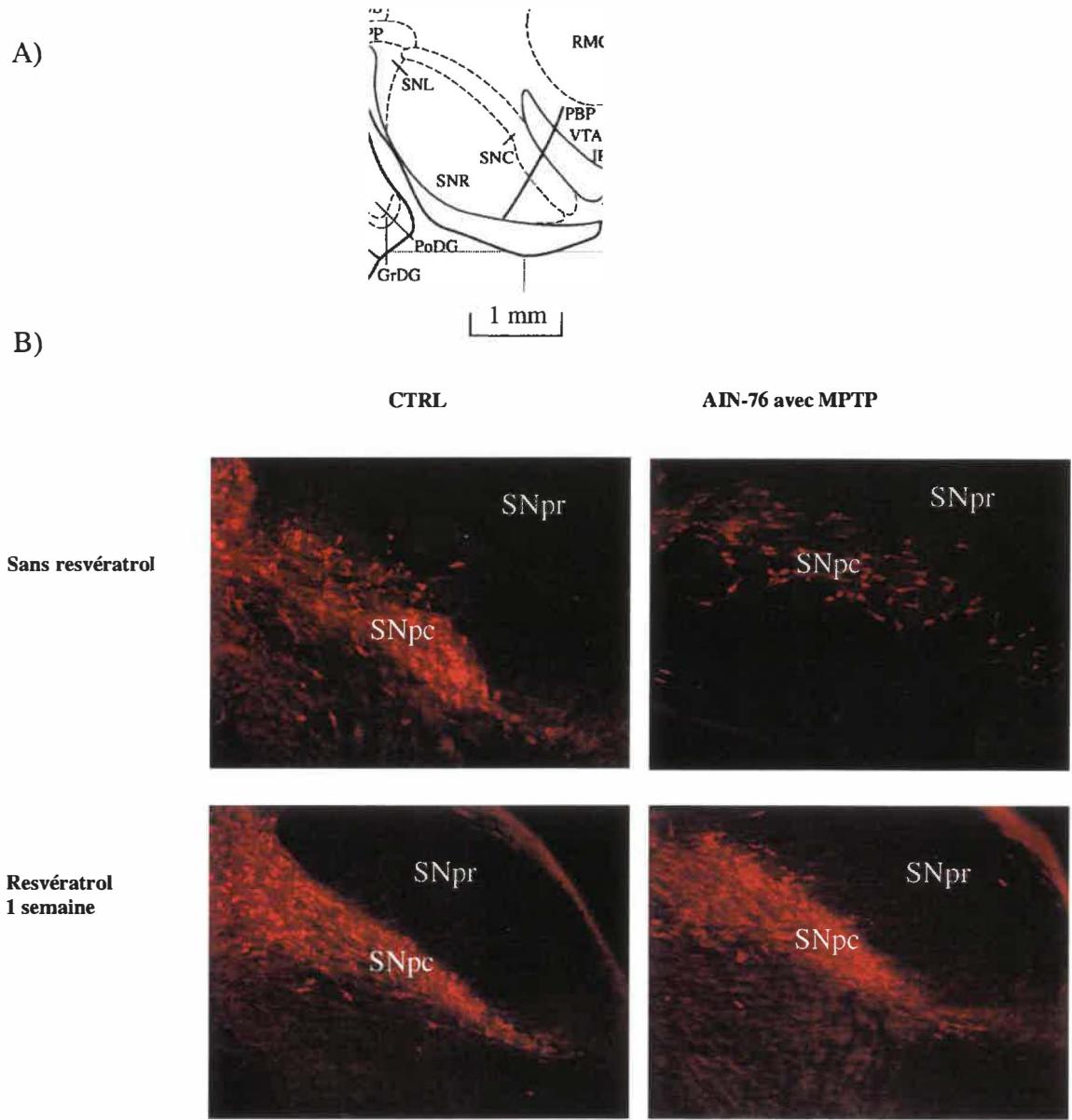


FIGURE 3.4 : A) Coupe coronale démontrant l'emplacement des coupes B) Schéma de la SNpc et de la SNpr.

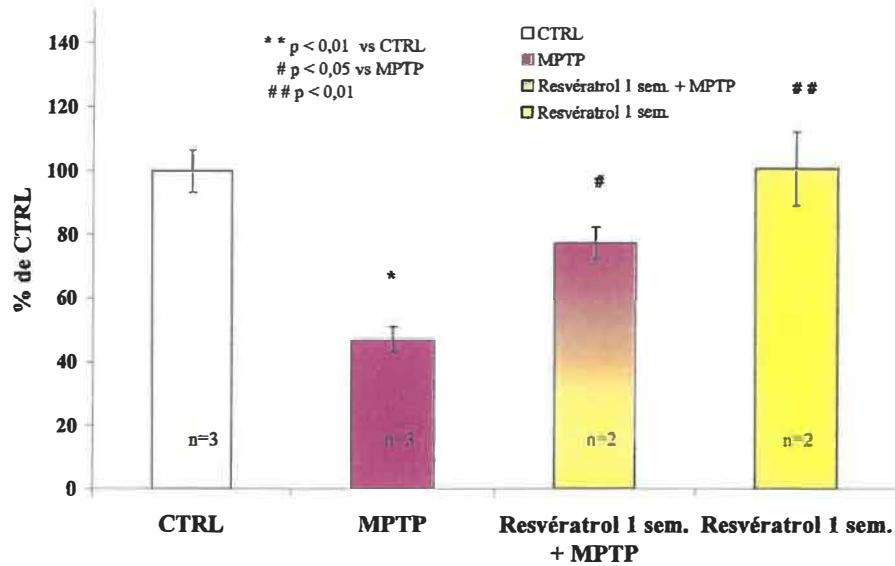


FIGURE 3.5 : Nombre de neurones TH positifs sur les coupes de SNpc.

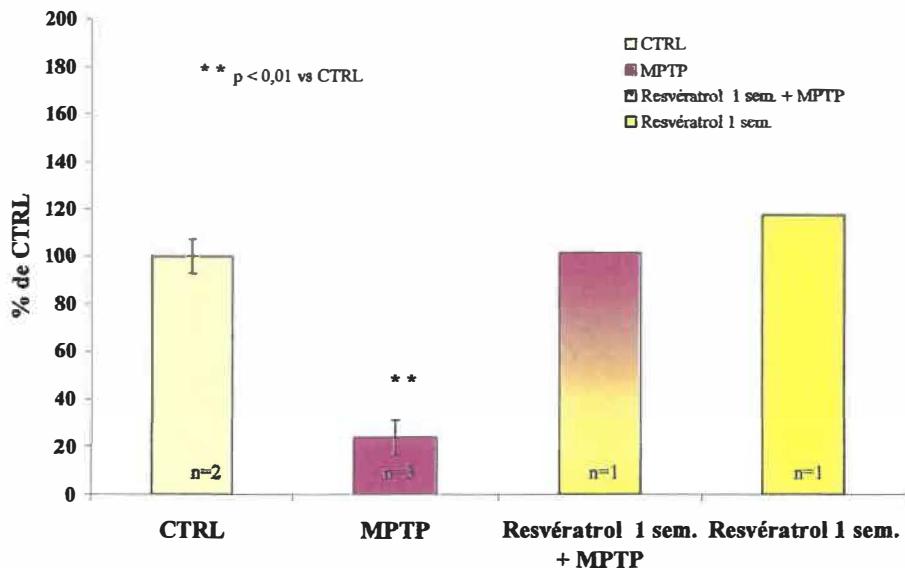


FIGURE 3.6 : Intensité de la fluorescence obtenue pour le marquage de la TH sur des coupes de SNpc.

3.2.2 Résultats de l'expérimentation B

3.2.2.1 Dosage de la DA au niveau du striatum

Comme la figure 3.7 le démontre, une baisse de 42% du taux de DA a été observée pour le groupe MPTP comparativement au groupe CTRL ($p < 0.001$). Le groupe ayant reçu le resvératrol seul pour une période de deux semaines résulte encore une fois en un taux de DA similaire à celui du groupe CTRL. La déplétion dopaminergique a encore une fois été fortement diminuée grâce au traitement conjoint du resvératrol avec le MPTP comparativement au groupe MPTP ($p < 0.05$). Les résultats sont exprimés en pourcentage de contrôle à la figure 3.7. Les chiffres indiqués dans les colonnes représentent le nombre d'animaux de chaque groupe.

3.2.2.2 Dosage de l'E₂ sanguin

La figure 3.8 révèle qu'une différence statistiquement significative a été obtenue pour les concentrations d'E₂ sanguin entre les groupes resvératrol 2 semaines + MPTP et le groupe CTRL ($p < 0.01$). Il en est de même pour le groupe ayant reçu le resvératrol ($p < 0.05$). Il a également été démontré que la concentration d'E₂ du groupe resvératrol 2 semaines + MPTP diffère significativement de celui du groupe MPTP ($p < 0.05$). Les chiffres indiqués dans les colonnes représentent le nombre d'animaux par groupe.

3.2.2.3 Quantification du taux de TH au niveau striatal par Western Blot

Les résultats de la figure 3.9 démontrent une forte diminution du taux de TH au niveau striatal pour le groupe MPTP (73%) comparativement au groupe CTRL. L'analyse de ce même graphique permet également de préciser que les taux de TH pour les groupes resvératrol 2 semaines et resvératrol 2 semaines + MPTP sont similaires à celui du groupe CTRL. Les résultats sont exprimés en pourcentage de contrôle et sont la moyenne de deux expériences.

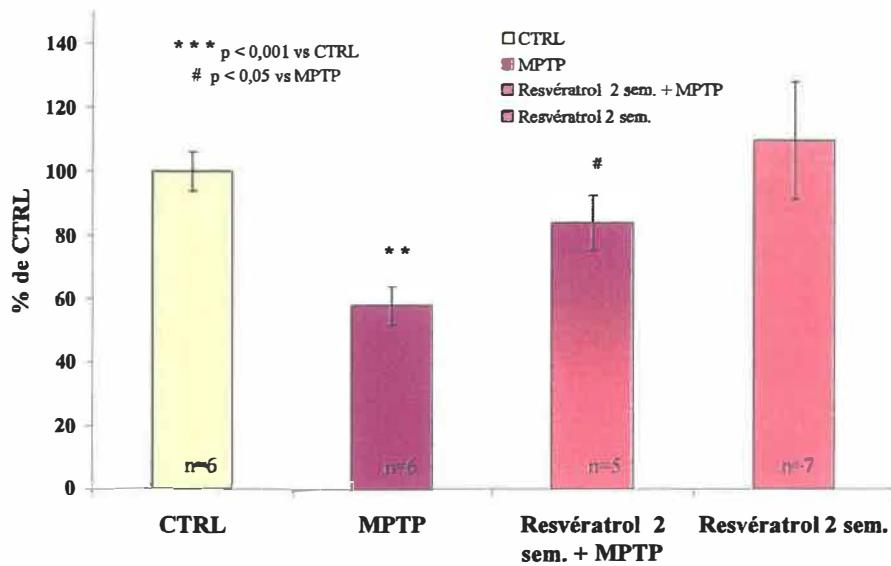


FIGURE 3.7 : Taux de dopamine obtenus par HPLC-ED pour des souris mâles de la souche C57Bl/6.

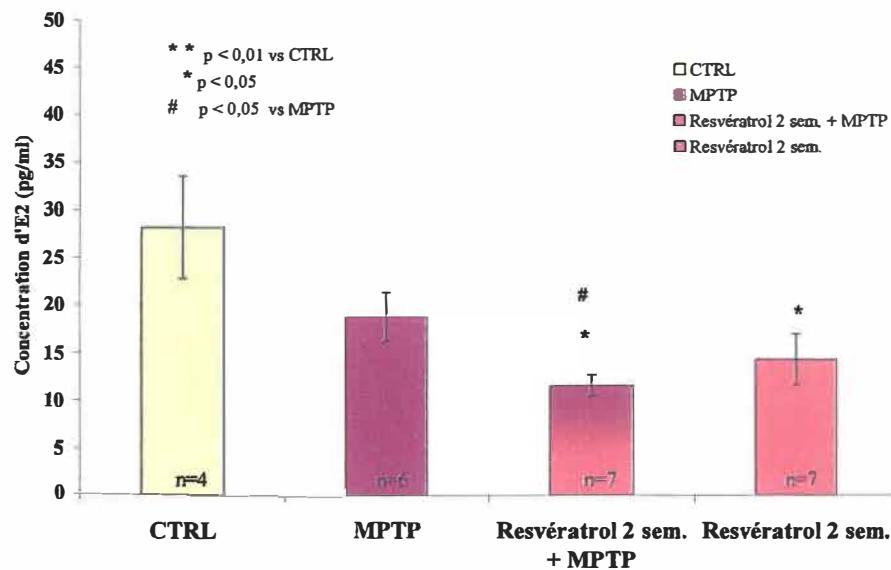


FIGURE 3.8 : Concentrations d'E2 obtenu par EIA pour des souris mâles de la souche C57Bl/6.

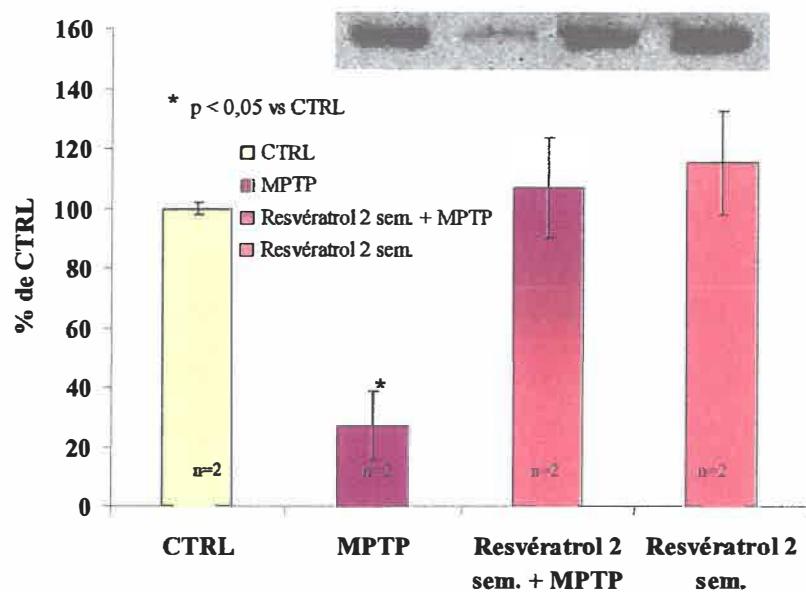


FIGURE 3.9 : Taux de TH au niveau striatal pour des souris de la souche C57Bl/6

cellules sont traitées conjointement avec le resvératrol et le MPP⁺ comparativement à celles traitées avec le MPP⁺ seul.

En ce qui concerne les expérimentations sur le plan *in vivo*, nous avons choisi le modèle murin traité avec le MPTP. Tel que décrit dans la section 1.6.1 de ce mémoire, le MPTP induit un syndrome parkinsonien presque identique chez les humains, les primates et les souris tant sur le plan clinique que neuropathologique [85]. Depuis quelques années, ce modèle est couramment utilisé chez la souris pour reproduire la déplétion dopaminergique caractéristique de la MP et continu d'être considéré comme l'un des meilleurs modèles expérimentaux [86]

De plus, Dluzen *et. al.* et Caillier *et. al.* ont démontré que l'E₂, lorsque donné quotidiennement pendant une certaine période, protège considérablement les neurones de la SNpc contre les dommages engendrés par le MPTP (10-15 mg/kg) chez des souris de la souche C57Bl/6 [55, 56, 59]. En outre, Bertelli *et. al.* ont démontré que le resvératrol entre rapidement dans la circulation sanguine et qu'il est retrouvé dans le plasma et différents organes [71, 87, 88]. Bien que la concentration de resvératrol retrouvée dans ces tissus soit inférieure à celle requise pour avoir un effet biologique, une consommation régulière et prolongée de resvératrol pourrait mener à une augmentation de la concentration de resvératrol dans ces tissus [71, 87, 88]. C'est d'ailleurs de cette manière qu'est expliqué l'effet bénéfique du resvératrol sur le système cardiovasculaire [87]. Par conséquent, le resvératrol cadre bien dans l'optique de stratégie préventive pour la MP.

Divers protocoles ont été testés pour l'incorporation du resvératrol dans la diète des souris, mais le gavage intra gastrique étant celui qui permettait le mieux de mesurer la quantité de resvératrol absorbé, seulement ces résultats sont présentés dans ce mémoire. Il est à noter que les doses choisies sont arbitraires et supérieures à la quantité pouvant être ingérée par l'homme en consommant du vin de façon modérée. En effet, la dose de resvératrol contenue dans une coupe de vin est d'environ 18 µg/kg [85].

Le resvératrol s'avère un très bon neuroprotecteur lorsqu'il est donné dans les conditions décrites pour l'expérimentation A, tel que décrit dans la section 3.2.1. Rappelons ici que cette expérimentation consistait à donner le resvératrol par gavage pendant 1 semaine à raison de 50 mg/kg une fois par jour et que le MPTP était injecté intrapéritonéalement, à une concentration de 10 mg/kg, la cinquième journée avant le sacrifice. Cette période de 5 jours permettait au MPTP d'être métabolisé et d'agir au niveau cérébral.

Le taux de DA retrouvé au niveau striatal pour les souris ayant reçu le resvératrol conjointement au MPTP est significativement supérieur à celui du groupe MPTP (58%). Nous pouvons donc conclure que le resvératrol possède *in vivo* le même pouvoir anti-oxydant que celui obtenu *in vitro* chez la lignée cellulaire PC12.

De plus, le resvératrol, possédant des propriétés estrogéniques et anti-estrogéniques, le dosage de l'E₂ sanguin a révélé que la neuroprotection observée chez les souris de la souche C57Bl/6 est bel et bien due au resvératrol lui-même et non à une modification de la concentration d'E₂ sanguin par le resvératrol. En effet, aucune différence significative n'a été détectée entre les divers groupes.

La neuroprotection médiée par le resvératrol est également visible par microscopie à fluorescence. En effet, l'analyse de l'intensité de la fluorescence a confirmé les résultats obtenus par HPLC-ED.

Toutefois, il devenait impératif de savoir s'ils étaient le fruit d'une véritable neuroprotection, dans le sens que les neurones demeurent viables, ou bien s'ils étaient dus à une modulation à la hausse de la synthèse de la TH dans les neurones survivants. Le décompte des neurones TH positifs par microscopie par fluorescence a permis en partie de nous éclairer à ce sujet. En effet, il a révélé que le traitement avec le resvératrol conjointement au MPTP prévient la mort neuronale puisque le nombre de neurones TH positifs pour le groupe resvératrol 1 semaine + MPTP est similaire à celui

du groupe CTRL. Il est toutefois nécessaire de répéter ces résultats de façon plus strictement quantitative, par exemple par marquage de la TH sur des sections en série.

L'expérimentation B (resvératrol 100 mg/kg pendant 2 semaines et MPTP 7 mg/kg) visait à vérifier des paramètres temporels à propos de la diète riche en resvératrol.

La quantification du taux de DA au niveau striatal a démontré encore une fois que le resvératrol protège les neurones du striatum contre la déplétion dopaminergique associée au MPTP. En effet, le taux de DA obtenu pour le groupe resvératrol 2 semaines + MPTP est supérieur à celui du groupe MPTP (25%).

Les analyses par immunobuvardage de type Western viennent également corroborer ces résultats puisque le taux de TH au niveau striatal des souris traitées avec le resvératrol pendant 2 semaines et traitées aussi avec le MPTP est similaire à celui du groupe CTRL. Étant donné qu'il avait été conclu lors de l'expérimentation A que le resvératrol agit en protégeant la viabilité des neurones, ce résultat ne peut donc être biaisé par une modulation à la hausse du taux de TH et, par conséquent, est réellement dû à une neuroprotection.

Par contre, le dosage de l'E₂ sanguin par EIA a démontré que le resvératrol, à une concentration de 100 mg/kg pendant 2 semaines, fait varier la concentration d'E₂. C'est donc dire qu'à cette concentration le resvératrol peut avoir des effets génomiques.

Ce dernier résultat ne vient toutefois en aucun temps discréder le resvératrol comme molécule anti-oxydante prometteuse au niveau de la MP. En effet, les résultats de l'expérimentation A démontrent bien la capacité du resvératrol pour contrer le stress oxydatif induit par la toxine MPTP. Les résultats de l'expérimentation B confirment qu'il faut être vigilant dans le choix de la concentration ainsi que dans la durée du traitement. Il est possible d'envisager d'autres expériences *in vivo* en utilisant des doses

intermédiaires de resvératrol, par exemple 75 mg/kg. De plus, la durée du traitement pourrait aussi être limitée à 4 ou 5 jours.

Ces résultats encourageant nous mènent maintenant vers d'autres avenues de recherche. Étant donné que le MPTP emprunte le DAT pour passer à l'intérieur des neurones (voir la section 1.6.1), il est de mise de vérifier si le resvératrol module le taux d'expression de ce transporteur au niveau neuronal.

Le dosage d'autres stéroïdes sanguins sera également effectué, entre autre la testostérone et le cholestérol afin de s'assurer que l'homéostasie endocrinienne est bien respectée dans ces expériences.

Il sera aussi intéressant de répéter les mêmes expérimentations avec des souris femelles. Dans ce cas, il faudra procéder à une ovariectomie prépubérale. Finalement, d'autres molécules d'origine naturelle telles que la sésamine, l'entérodiol et l'entérolactone sont maintenant à l'essai dans notre laboratoire pour corroborer et amplifier les résultats obtenus avec le resvératrol.

BIBLIOGRAPHIE

1. Dauer, W., Przedborski, S., *Parkinson's disease: mechanisms and models*. Neuron, 2003. **39**(6): p. 889-909.
2. Pollack, P., *La maladie de Parkinson*. Éditions Odile Jacob ed. 2000, Paris. 177 pages.
3. Forno, L.S., *Concentric hyalin intraneuronal inclusions of Lewy type in the brains of elderly persons (50 incidental cases): relationship to parkinsonism*. J Am Geriatr Soc, 1969. **17**(6): p. 557-75.
4. Bancher, C., Lassmann, H., Budka, H., Jellinger, K., Grundke-Iqbali, I., Iqbal, K., Wiche, G., Seitelberger, F., Wisniewski, H.M., *An antigenic profile of Lewy bodies: immunocytochemical indication for protein phosphorylation and ubiquitination*. J Neuropathol Exp Neurol, 1989. **48**(1): p. 81-93.
5. Trojanowski, J.Q., Goedert, M., Iwatsubo, T., Lee, V. M., *Fatal attractions: abnormal protein aggregation and neuron death in Parkinson's disease and Lewy body dementia*. Cell Death Differ, 1998. **5**(10): p. 832-7.
6. Chen, Q., Thorpe, J., Keller, J. N., *alpha-Synuclein alters proteasome function, protein synthesis, and stationary phase viability*. J Biol Chem, 2005. **280**(34): p. Epub 2005 Jun 7.
7. Kaul, S., Anantharam, V., Kanthasamy, A., Kanthasamy, A. G., *Wild-type alpha-synuclein interacts with pro-apoptotic proteins PKCdelta and BAD to protect dopaminergic neuronal cells against MPP(+) -induced apoptotic cell death*. Brain Res Mol Brain Res, 2005. **139**(1): p. 137-52.
8. Smythies, J., Galzigna, L., *The oxidative metabolism of catecholamines in the brain: a review*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1380**(2): p. 159-62.
9. Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T., *3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists*. Nature, 1957. **180**(4596): p. 1200.
10. Gray, F., *Neuropathologie des syndromes parkinsoniens*. Rev. Neurol., 1988. **144**(4): p. 229-48.
11. Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.S., McNamara, J.O., *Neurosciences*. 1999: De Boeck Université s.a. 602 pages.
12. Zigmond M.J., B.F.E., Landis S.C. Roberts J.L., Squire L.R., *Fundamental Neuroscience*. 1999, London: Academic Press. 967-969, 1600 pages.
13. Vila M. and P. S., *Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease*. Nature Medecine, 2004(July): p. S58-S62.
14. Zhang, Y., Dawson, V. L., Dawson, T. M., *Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease*. Neurobiol Dis, 2000. **7**(4): p. 240-50.
15. Bossy-Wetzel, E., Schwarzenbacher, R., Lipton, S. A., *Molecular pathways to neurodegeneration*. Nat Med, 2004. **10 Suppl**: p. S2-9.
16. Uversky, V.N., *Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration*. Cell Tissue Res, 2004. **318**(1): p. 225-41.
17. Li, X., Sun, A. Y., *Paraquat induced activation of transcription factor AP-1 and apoptosis in PC12 cells*. J Neural Transm, 1999. **106**(1): p. 1-21.

18. Andersen, J.K., *Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?* Nat Med, 2004. **10 Suppl**: p. S18-25.
19. Cohen G., W.P., *Free radicals, oxidative stress, and neurodegeneration. In Neurodegenerative diseases.* D.B. Calne ed. ed. 1994, Philadelphia, pp. 139-161.
20. Gutteridge J.M.C., H.B., *Oxidative stress, brain iron and neurodegeneration. Basic principles.* 1996.
21. Obata, T., *Role of hydroxyl radical formation in neurotoxicity as revealed by in vivo free radical trapping.* Toxicol Lett, 2002. **132**(2): p. 83-93.
22. Thomas B., D.M., Kochupurackal P.M., *In vivo hydroxyl radical generation in the striatum following systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice.* Brain Research, 2000. **858**: p. 221-224.
23. Fiskum, G., Starkov, A., Polster, B. M., Chinopoulos, C., *Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease.* Ann N Y Acad Sci, 2003. **991**: p. 111-9.
24. Gutteridge J.M.C., H.B., *Antioxidants in nutrition, health, and disease.* 1994: p. 142 pages.
25. Bharath, S., Hsu, M., Kaur, D., Rajagopalan, S., Andersen, J. K., *Glutathione, iron and Parkinson's disease.* Biochem Pharmacol, 2002. **64**(5-6): p. 1037-48.
26. Gelinas, S., Martinoli, M. G., *Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP⁺-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells.* J Neurosci Res, 2002. **70**(1): p. 90-6.
27. Javoy, F., Sotelo, C., Herbet, A., Agid, Y., *Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system.* Brain Res, 1976. **102**(2): p. 201-15.
28. Jourdain S., M.M., Morin N., Di Paolo T., *Oestrogens prevent loss of dopamine transporter (DAT) and vesicular monoamine transporter (VMAT2) in substantia nigra of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mice.* J. Neuroendocrinol., 2005 Aug. **17**(8): p. 509-17.
29. McKinley, E.T., Baranowski, T.C., Blavo, D.O., Cato, C., Doa, T.N., Rubinstein, A.L., *Neuroprotection of MPTP-induced toxicity in zebrafish dopaminergic neurons.* Brain Res Mol Brain Res., 2005 Nov 30. **141**(2): p. 128-37.
30. Widdowson, P.S., Farnworth, M. J., Simpson, M. G., Lock, E. A., *Influence of age on the passage of paraquat through the blood-brain barrier in rats: a distribution and pathological examination.* Hum Exp Toxicol, 1996. **15**(3): p. 231-6.
31. Widdowson, P.S., Farnworth, M. J., Upton, R., Simpson, M. G., *No changes in behaviour, nigro-striatal system neurochemistry or neuronal cell death following toxic multiple oral paraquat administration to rats.* Hum Exp Toxicol, 1996. **15**(7): p. 583-91.
32. Lapointe, N., St-Hilaire, M., Martinoli, M. G., Blanchet, J., Gould, P., Rouillard, C., Cicchetti, F., *Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity.* Faseb J, 2004. **18**(6): p. 717-9.
33. McKinley ET, et al., *Neuroprotection of MPTP-induced toxicity in zebrafish dopaminergic neurons.* Brain Res Mol Brain Res., 2005 Nov 30. **141**(2): p. 128-37.
34. Langston J.W., B.P., Tetrud J.W., Irwin I., *Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis.* Science, 1983. **219**: p. 979-980.

35. Burns R.S., C.C.C., Markey S.P., Ebert M.H., Jacobowitz D.M., Kopin I.J., *A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1983. **80**: p. 4546-4550.
36. Heikkila R.E., H.A., Duvoisin R.C., *Science*. Science, 1984. **224**: p. 1451-1453.
37. Langston J.W., F.L.S., Rebert C.S., Irwin I., *Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in squirrel monkey*. Brain Res, 1984. **292**: p. 390-4.
38. Heikkila, R.E., Mansino L., Cabbat F.S., Duvoisin R.C., *Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors*. Nature, 1984. **311**: p. 467-9.
39. Santiago, M., Machado, A., Cano, J., *Nigral and striatal comparative study of the neurotoxic action of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion: involvement of dopamine uptake system*. J Neurochem, 1996. **66**(3): p. 1182-90.
40. Bezard, E., Gross, C. E., Fournier, M. C., Dovero, S., Bloch, B., Jaber, M., *Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter*. Exp Neurol, 1999. **155**(2): p. 268-73.
41. Klaidman, L.K., Adams, J. D., Jr., Leung, A. C., Kim, S. S., Cadena, E., *Redox cycling of MPP⁺: evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase*. Free Radic Biol Med, 1993. **15**(2): p. 169-79.
42. Ramsay, R.R., Singer, T. P., *Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria*. J Biol Chem, 1986. **261**(17): p. 7585-7.
43. Reinhard Jr. J.F., D.J.E.J., Viveros O.H., Daniels A.J., *Subcellular compartmentalization of 1-methyl-4-phenylpyridinium with catecholamines in adrenal medullary chromaffin vesicles may explain the lack of toxicity to adrenal chromaffin cells*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1987. **84**: p. 8160-8164.
44. Lotharius, J., O'Malley, K. L., *The parkinsonism-inducing drug 1-methyl-4-phenylpyridinium triggers intracellular dopamine oxidation. A novel mechanism of toxicity*. J Biol Chem, 2000. **275**(49): p. 38581-8.
45. Obata, T., *Dopamine efflux by MPTP and hydroxyl radical generation*. J Neural Transm, 2002. **109**(9): p. 1159-80.
46. Obata, T., Yamanaka, Y., Kinemuchi, H., Oreland, L., *Release of dopamine by perfusion with 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(+)) into the striatum is associated with hydroxyl free radical generation*. Brain Res, 2001. **906**(1-2): p. 170-5.
47. Speciale, S.G., *MPTP: insights into parkinsonian neurodegeneration*. Neurotoxicol Teratol, 2002. **24**(5): p. 607-20.
48. Mandavilli, B.S., Ali, S. F., Van Houten, B., *DNA damage in brain mitochondria caused by aging and MPTP treatment*. Brain Res, 2000. **885**(1): p. 45-52.
49. Staal, R.G., Sonsalla, P. K., *Inhibition of brain vesicular monoamine transporter (VMAT2) enhances 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity in vivo in rat striata*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **293**(2): p. 336-42.
50. Przuntek, H., Welzel, D., Gerlach, M., Blumner, E., Danielczyk, W., Kaiser, H. J., Kraus, P. H., Letzel, H., Riederer, P., Uberla, K., *Early institution of bromocriptine in Parkinson's disease inhibits the emergence of levodopa-*

- associated motor side effects. Long-term results of the PRADO study.* J Neural Transm, 1996. **103**(6): p. 699-715.
51. Leranth, C., Roth, R. H., Elsworth, J. D., Naftolin, F., Horvath, T. L., Redmond, D. E., Jr., *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.
52. Behl, C., *Estrogen can protect neurons: modes of action.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2002. **83**(1-5): p. 195-7.
53. Behl, C., *Oestrogen as a neuroprotective hormone.* Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(6): p. 433-42.
54. Behl, C., Skutella, T., Lezoualc'h, F., Post, A., Widmann, M., Newton, C. J., Holsboer, F., *Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship.* Mol Pharmacol, 1997. **51**(4): p. 535-41.
55. Callier, S., Morissette, M., Grandbois, M., Di Paolo, T., *Stereospecific prevention by 17beta-estradiol of MPTP-induced dopamine depletion in mice.* Synapse, 2000. **37**(4): p. 245-51.
56. Dluzen, D.E., McDermott, J. L., Liu, B., *Estrogen as a neuroprotectant against MPTP-induced neurotoxicity in C57/B1 mice.* Neurotoxicol Teratol, 1996. **18**(5): p. 603-6.
57. Gerlach, M., Riederer, P., Przuntek, H., Youdim, M. B., *MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease.* Eur J Pharmacol, 1991. **208**(4): p. 273-86.
58. Michel, M.C., Rother, A., Hiemke, C., Ghraf, R., *Inhibition of synaptosomal high-affinity uptake of dopamine and serotonin by estrogen agonists and antagonists.* Biochem Pharmacol, 1987. **36**(19): p. 3175-80.
59. Dluzen, D.E., *Neuroprotective effects of estrogen upon the nigrostriatal dopaminergic system.* J Neurocytol, 2000. **29**(5-6): p. 387-99.
60. Shulman LM., *Is there a connection between estrogen and Parkinson's disease?* Parkinsonism and Related Disorders, 2002. **8**: p. 289-295.
61. Norman, *Hormones.* 1987. p. 735, 806 pages.
62. Boroditsky, R.S., *Balancing safety and efficacy focus on endometrial protection.* J Reprod Med, 2000 Mar. **45**(3 suppl): p. 273-84.
63. Spicer, D.V., Pike, M.C., *Sex steroids and breast cancer prevention.* J Natl Cancer Inst Monogr, 1994(16): p. 139-47.
64. Bowers, J.L., Tyulmenkov, V. V., Jernigan, S. C., Klinge, C. M., *Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta.* Endocrinology, 2000. **141**(10): p. 3657-67.
65. Fremont, L., *Biological effects of resveratrol.* Life Sci, 2000. **66**(8): p. 663-73.
66. de Santi, C., Pietrabissa, A., Mosca, F., Pacifici, G. M., *Glucuronidation of resveratrol, a natural product present in grape and wine, in the human liver.* Xenobiotica, 2000. **30**(11): p. 1047-54.
67. De Santi, C., Pietrabissa, A., Spisni, R., Mosca, F., Pacifici, G. M., *Sulphation of resveratrol, a natural product present in grapes and wine, in the human liver and duodenum.* Xenobiotica, 2000. **30**(6): p. 609-17.
68. Kuhnle, G., Spencer, J. P., Chowrimootoo, G., Schroeter, H., Debnam, E. S., Srai, S. K., Rice-Evans, C., Hahn, U., *Resveratrol is absorbed in the small*

- intestine as resveratrol glucuronide.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **272**(1): p. 212-7.
69. Meng, X., Maliakal, P., Lu, H., Lee, M. J., Yang, C. S., *Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice.* J Agric Food Chem, 2004. **52**(4): p. 935-42.
70. Vitrac, X., Desmouliere, A., Brouillaud, B., Krisa, S., Deffieux, G., Barthe, N., Rosenbaum, J., Merillon, J. M., *Distribution of [¹⁴C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration.* Life Sci, 2003. **72**(20): p. 2219-33.
71. Bertelli, A., Bertelli, A. A., Gozzini, A., Giovannini, L., *Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity.* Drugs Exp Clin Res, 1998. **24**(3): p. 133-8.
72. Gehm, B.D., McAndrews, J. M., Chien, P. Y., Jameson, J. L., *Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 14138-43.
73. Klinge, C.M., Risinger, K. E., Watts, M. B., Beck, V., Eder, R., Jungbauer, A., *Estrogenic activity in white and red wine extracts.* J Agric Food Chem, 2003. **51**(7): p. 1850-7.
74. Mazur, W., *Phytoestrogen content in foods.* Baillieres Clin Endocrinol Metab, Dec 1998. **12**(4): p. 729-42.
75. Basly, J.P., Marre-Fournier, F., Le Bail, J. C., Habrioux, G., Chulia, A. J., *Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol.* Life Sci, 2000. **66**(9): p. 769-77.
76. Belguendouz, L., Fremont, L., Linard, A., *Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins.* Biochem Pharmacol, 1997. **53**(9): p. 1347-55.
77. Fremont, L., Belguendouz, L., Delpal, S., *Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids.* Life Sci, 1999. **64**(26): p. 2511-21.
78. Stojanovic, S., Sprinz, H., Brede, O., *Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation.* Arch Biochem Biophys, 2001. **391**(1): p. 79-89.
79. Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., Pezzuto, J. M., *Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes.* Science, 1997. **275**(5297): p. 218-20.
80. Mgbonyebi, O.P., Russo, J., Russo, I. H., *Antiproliferative effect of synthetic resveratrol on human breast epithelial cells.* Int J Oncol, 1998. **12**(4): p. 865-9.
81. Norman, A.W., Litwack, G., *Hormones.* 1987, San Diego: Academic Press. 806 pages.
82. Le Corre, L., Chalabi, N., Delort, L., Bignon, Y.J., Bernard-Gallon, D.J., *Resveratrol and breast cancer chemoprevention: molecular mechanisms.* Mol Nutr food Res, 2005. **49**(5): p. 462-71.
83. Signorelli, P., Ghidoni, R., *Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises.* J Nutr Biochem, 2005. **16**(8): p. 449-66.
84. Gagne, B., Gelinas, S., Bureau, G., Lagace, B., Ramassamy, C., Chiasson, K., Valastro, B., Martinoli, M.G., *Effects of estradiol, phytoestrogens, and Ginkgo*

- biloba extracts against 1-methyl-4-phenyl-pyridine-induced oxidative stress.* Endocrine, 2003. 21(1): p. 89-95.
85. Gesher, A.J., Steward, W.P., *Relationship between Mechanisms, Bioavailability, and Preclinical Chemopreventive Efficacy of Resveratrol: A Conundrum.* Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention. 12(October 2003): p. 953-57.
86. Przedborski, S., Tieu, K., Perier, C., Vila, M., *MPTP as a Mitochondrial Neurotoxic model of Parkinson's disease.* Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 2004. 36(4, August 2004): p. 375-79.
87. Bertelli, A.A., Giovannini, L., Stradi, R., Bertelli, A., Tillement, J. P., *Plasma, urine and tissue levels of trans- and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats.* Int J Tissue React, 1996. 18(2-3): p. 67-71.
88. Bertelli, A.A., Giovannini, L., Stradi, R., Urien, S., Tillement, J. P., Bertelli, A., *Kinetics of trans- and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after red wine oral administration in rats.* Int J Clin Pharmacol Res, 1996. 16(4-5): p. 77-81.