

# Propriétés neuroprotectrices, antioxydantes et anti-inflammatoires du resvératrol sur des neurones dopaminergiques en culture



Julie Bournival, Geneviève Bureau, Justine Renaud et Maria-Grazia Martinoli  
Laboratoire de recherche en neurobiologie cellulaire, Université du Québec à Trois-Rivières



## INTRODUCTION

Le resvératrol est reconnu pour ses effets anti-inflammatoires et cardioprotecteurs. Plusieurs travaux suggèrent que ce polyphénol naturel (figure 1), notamment retrouvé dans le vin, possède des propriétés antioxydantes qui pourraient réduire la formation de radicaux libres menant au stress oxydant et à l'apoptose des neurones dopaminergiques (DAergiques), caractéristiques de la maladie de Parkinson (MD). Des études récentes démontrent que la diminution du stress oxydant et de la neuroinflammation peut prévenir la dégénération de neurones DAergiques.

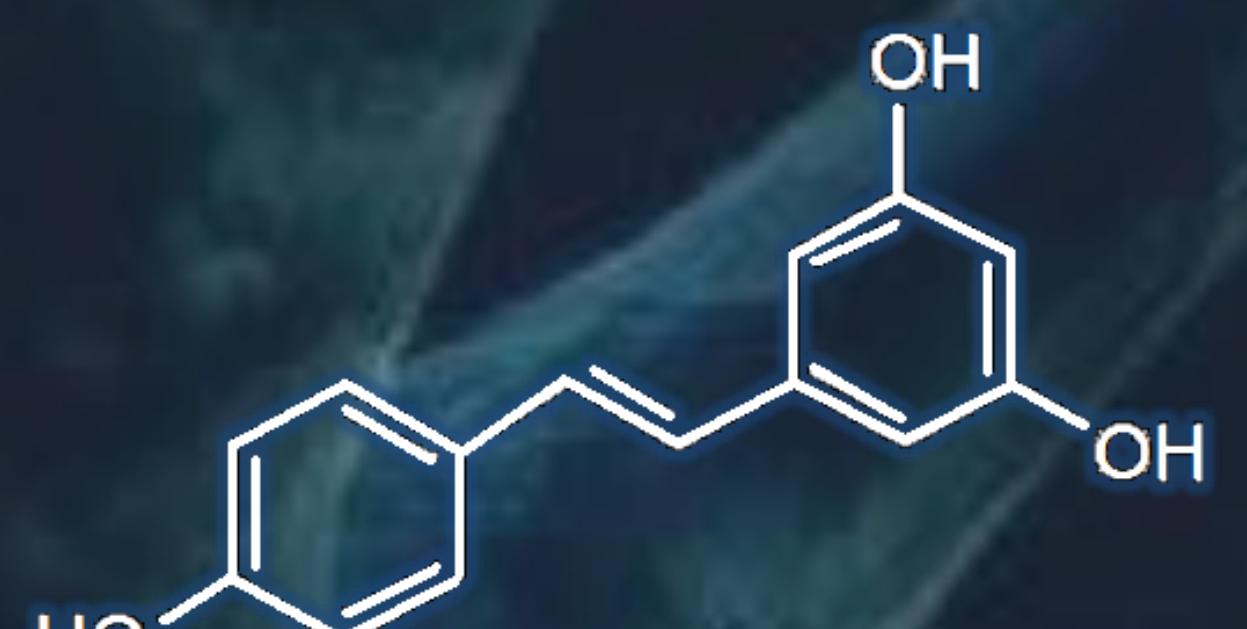


Figure 1. Resvératrol.

### Les buts de notre étude :

1. évaluer l'effet du resvératrol sur la cascade apoptotique induite par l'administration de MPP+, une neurotoxine responsable de la mort sélective des neurones DAergiques
2. évaluer l'effet du resvératrol contre l'inflammation induite par le lipopolysaccharide (LPS) dans un système de co-culture microglie-neurone

- Principes pris en compte lors de cette étude :
  - Le cerveau compte plusieurs sortes de cellules justifiant l'usage d'un système de co-culture
  - Certaines de ces cellules, les microglies, ont la capacité d'adopter un état activé dans lequel ils peuvent produire des facteurs nocifs pour les neurones
  - L'apoptose est une forme de mort cellulaire programmée
  - La MD est causée par la neuroinflammation et le stress oxydant, eux-mêmes directement liés à l'apoptose

## MÉTHODOLOGIE

### Culture et traitement des cellules :

Les cellules neuronales PC12 ont été cultivées dans du milieu RPMI et les cellules gliales N9, dans du milieu DMEM-F12. La différenciation des cellules neuronales a été induite par le NGF (Anglais : nerve growth factor). Les prétraitements ont été effectués sur 3h avec du resvératrol (figure 1). Les traitements ont été effectués sur 24h avec du MPP+ (figure 2) chez les neurones différenciés, et avec du LPS (figure 3) chez les microglies. Dans certaines expériences, les neurones étaient cultivées en puits et les microglies en inserts déposés dans les puits. Ceci constituait le système de co-culture (figure 4).

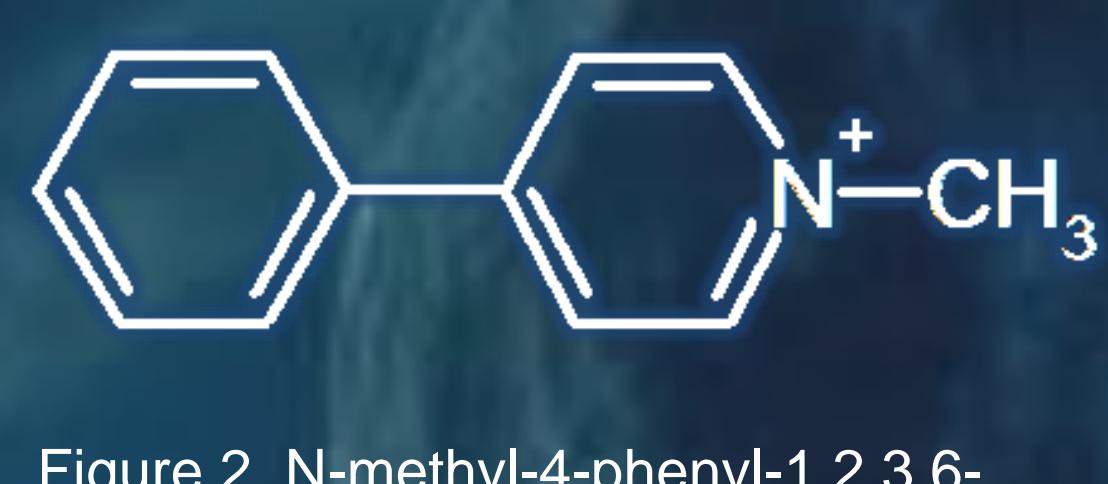


Figure 2. N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPP+).

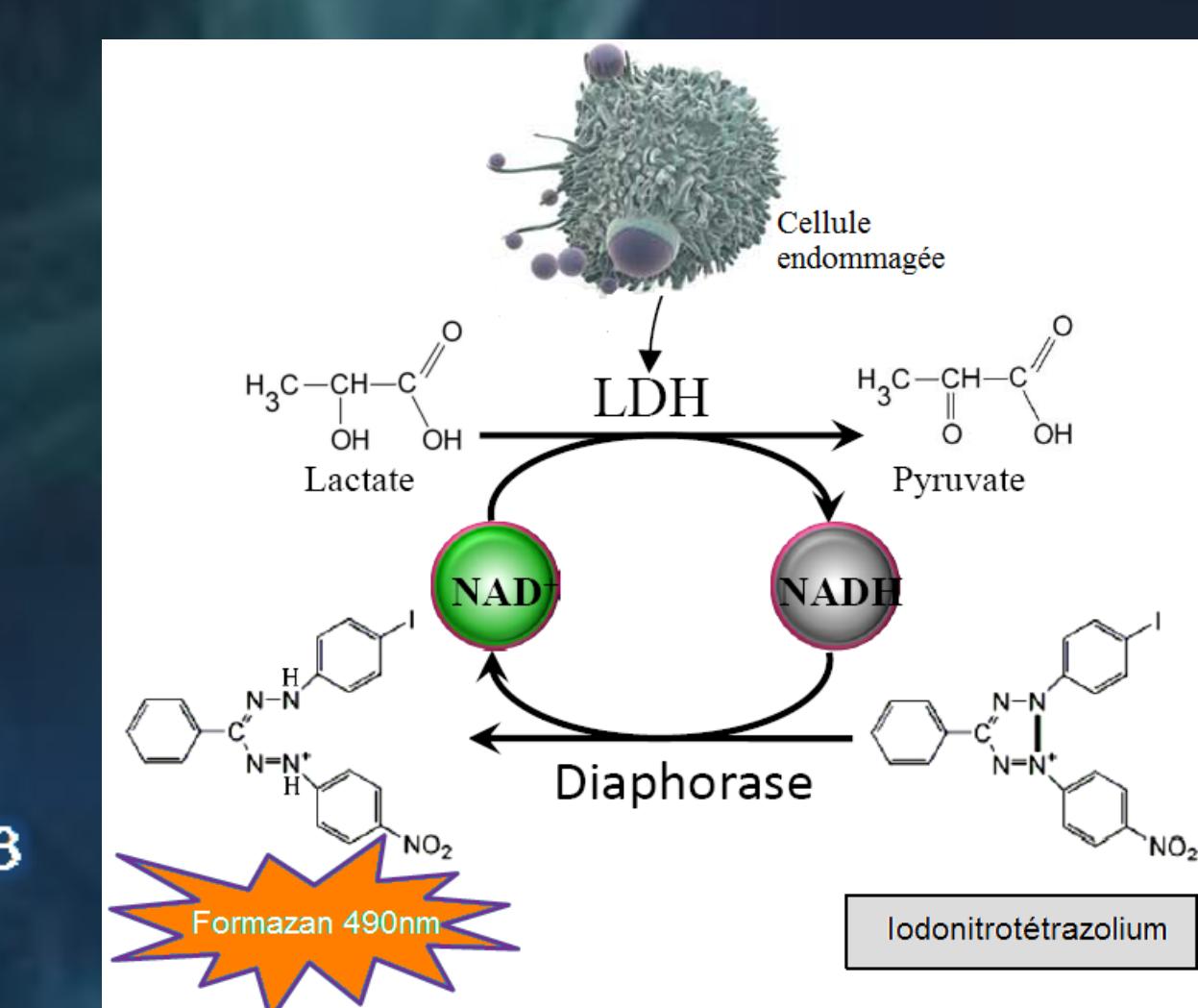


Figure 5. Détection de la LDH par analyse colorimétrique.

### Analyse quantitative de la LDH :

La cytotoxicité a été quantifiée par une analyse colorimétrique qui mesure l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) relâchée dans le milieu extracellulaire par les cellules endommagées (figure 5).

### Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN :

L'apoptose a été évaluée par une analyse colorimétrique qui emploi un anticorps spécifique contre l'ADN simple brin se retrouvant distinctivement dans des noyaux en apoptose (figure 6).

### Electrophorèse et immunobuvardage de type Western :

L'expression des protéines pro-apoptotiques, AIF et BAX, et anti-apoptotique, Bcl-2, a été évaluée en extrayant les protéines totales (fractions cytoplasmiques et nucléaires séparées pour AIF) afin de les faire migrer sur un gel de polyacrylamide selon leur taille. Les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF et l'intensité des bandes d'intérêt a été quantifiée par chimiluminescence.

### RTq-PCR :

La transcription des gènes IL-1 $\alpha$  et TNF- $\alpha$  a été analysée en effectuant la transcription réverse des ARNm de ces cytokines pro-inflammatoires puis en amplifiant ces séquences afin de les quantifier.

### Analyse TUNEL :

L'apoptose a été évaluée par une analyse fluorimétrique de la fragmentation de l'ADN usant la transférase terminale (figure 7), enzyme catalysant l'ajout de désoxynucléotides fluorescents aux extrémités 3' hydroxyle générées par la fragmentation de l'ADN.

### Immunofluorescence :

L'apoptose a été évaluée par une analyse fluorimétrique de la protéolyse de la caspase-3 qui emploi un anticorps spécifique contre cette protéine médiateuse de la mort cellulaire programmée.

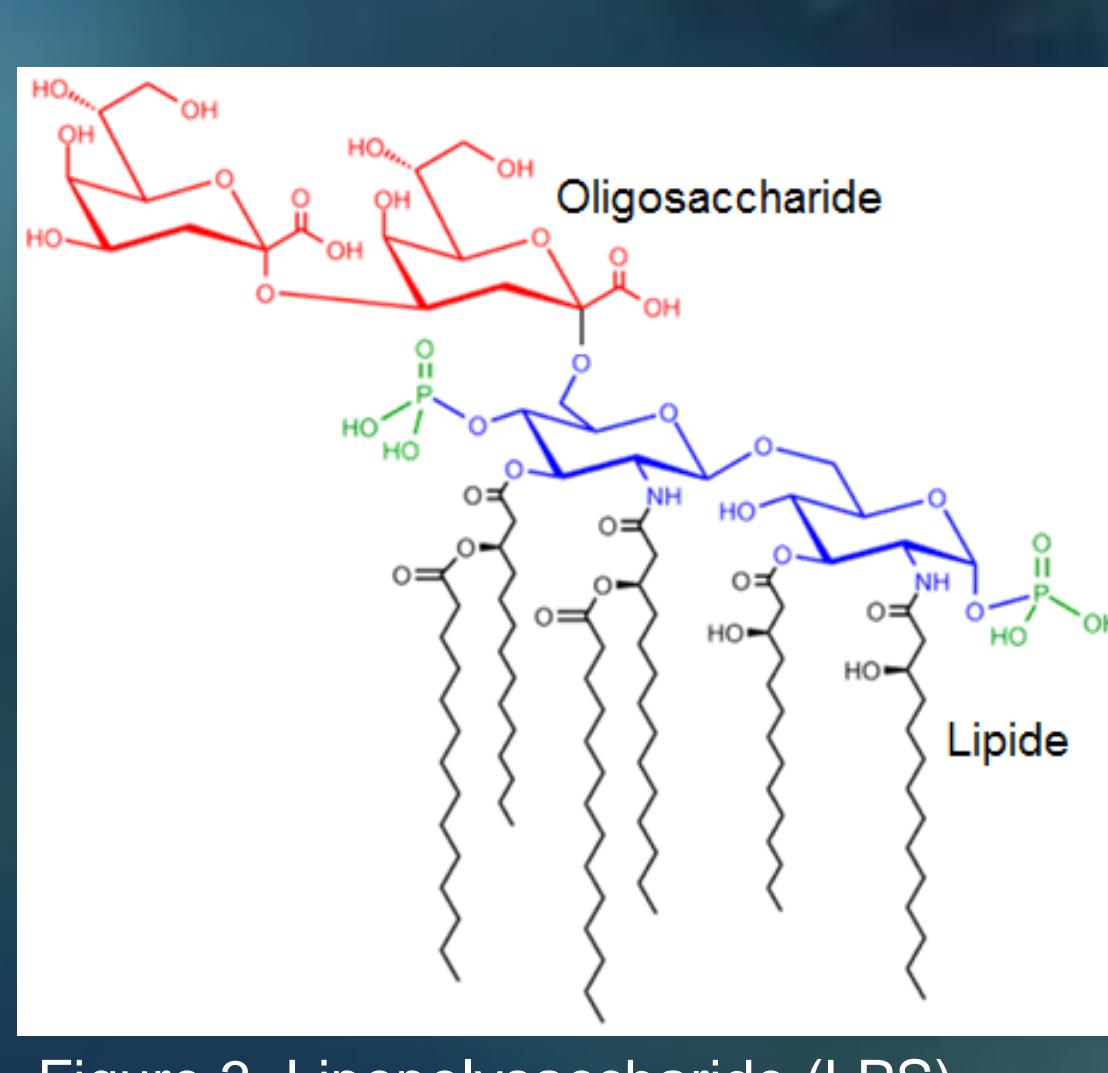


Figure 3. Lipopolysaccharide (LPS).

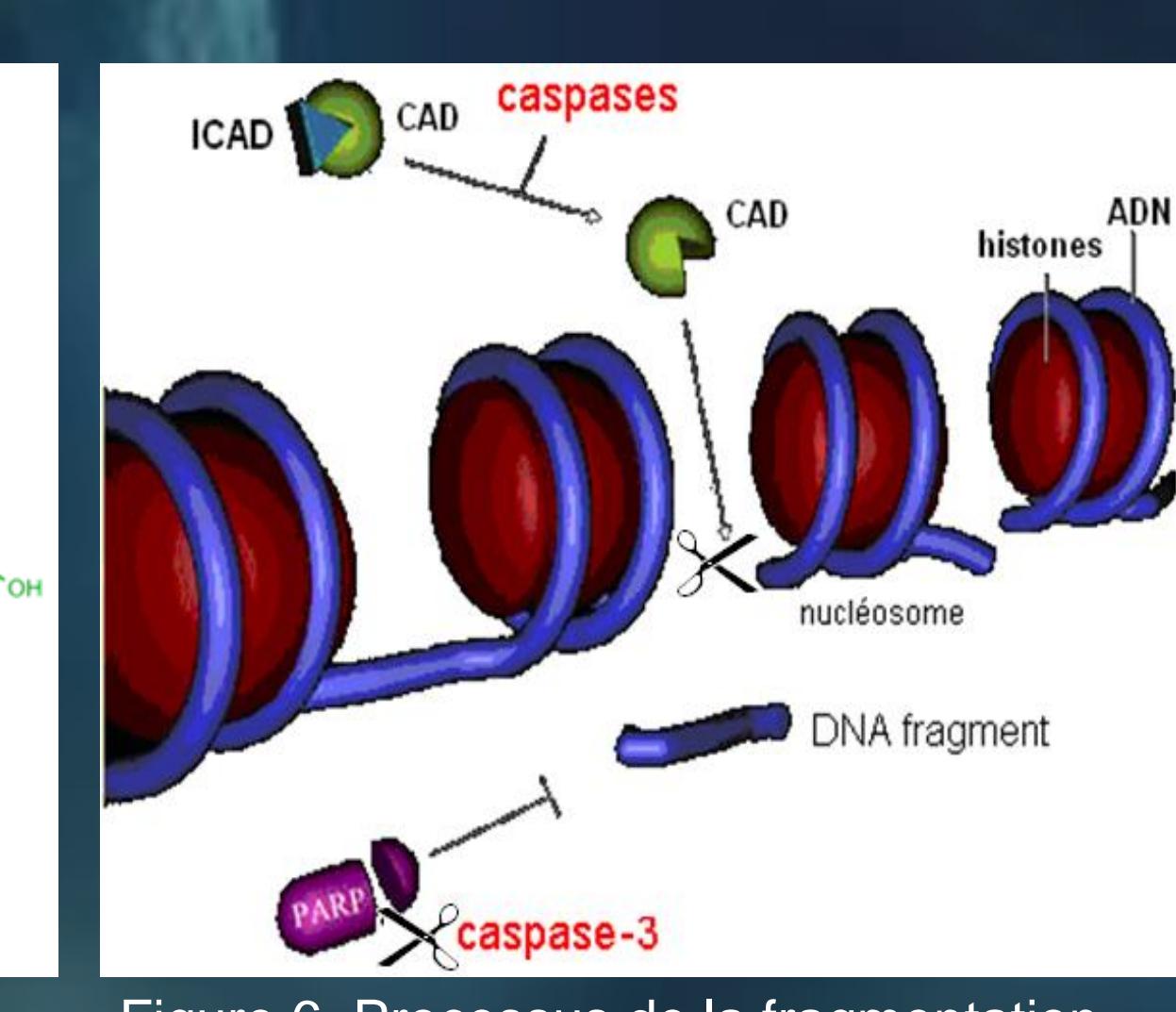


Figure 6. Processus de la fragmentation de l'ADN.

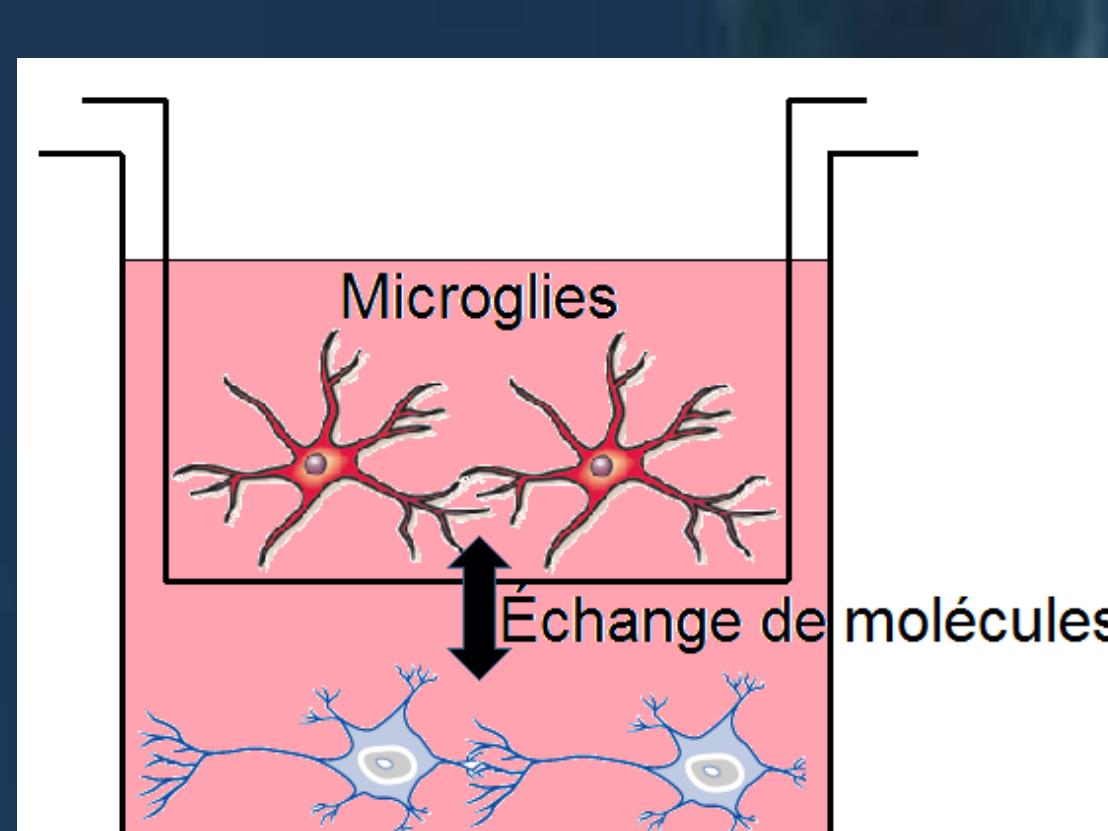


Figure 4. Système de co-culture microglie-neurone.

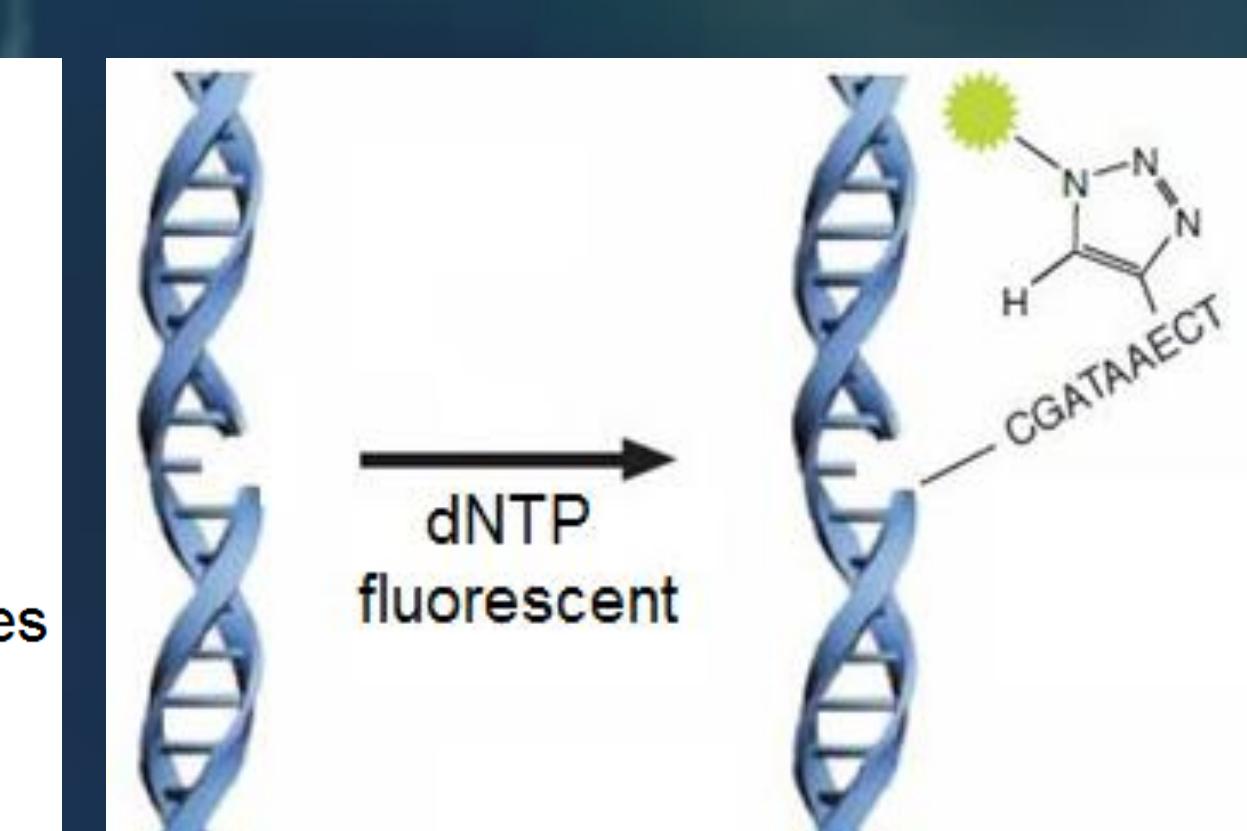


Figure 7. Détection de la fragmentation de l'ADN par analyse TUNEL.

## RÉSULTATS

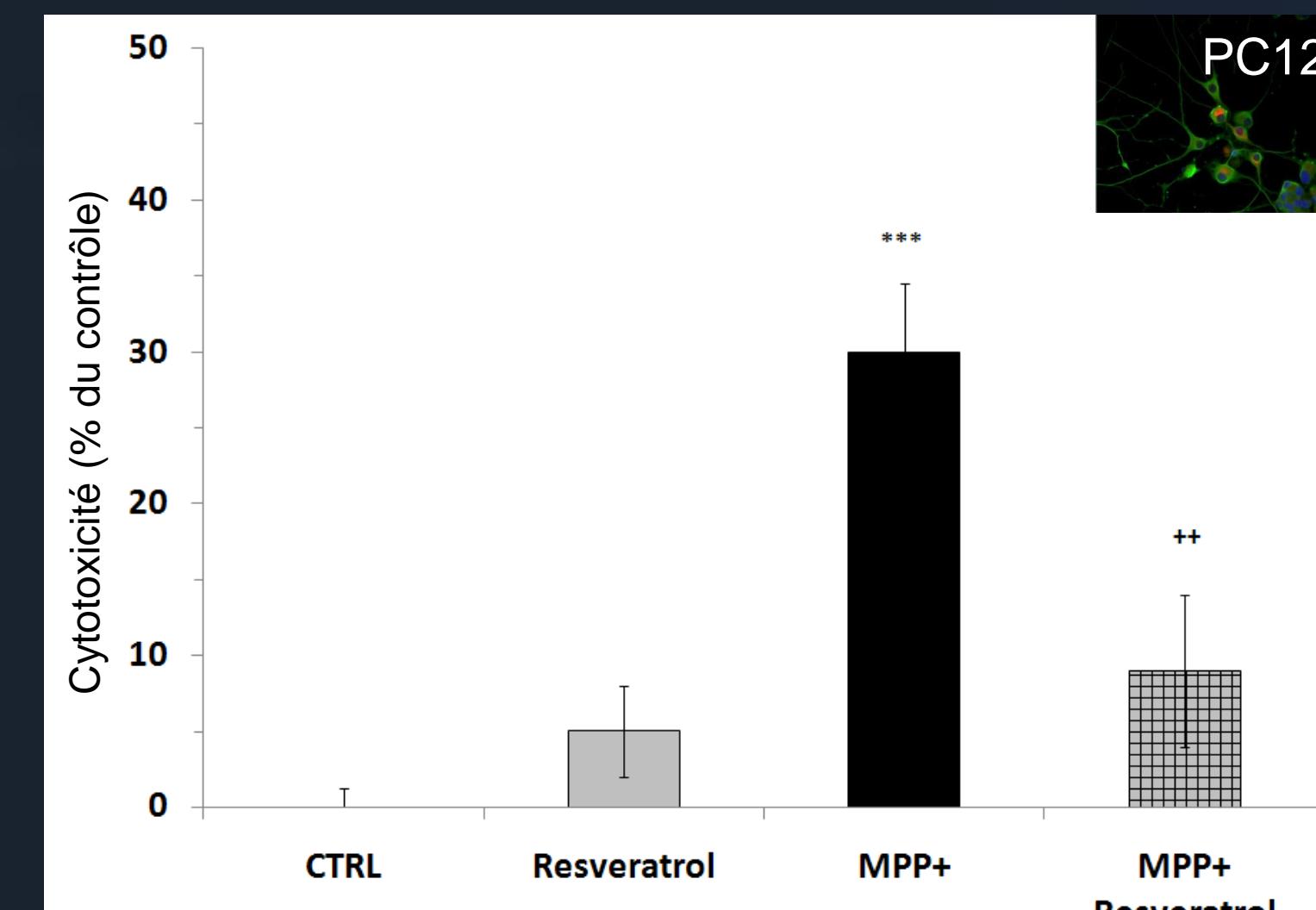


Figure 8. Effet du resvératrol sur la toxicité chez les neurones. Nos résultats montrent que le resvératrol a des propriétés neuroprotectrices, car il réduit de 20% la mort neuronale induite par le MPP+.

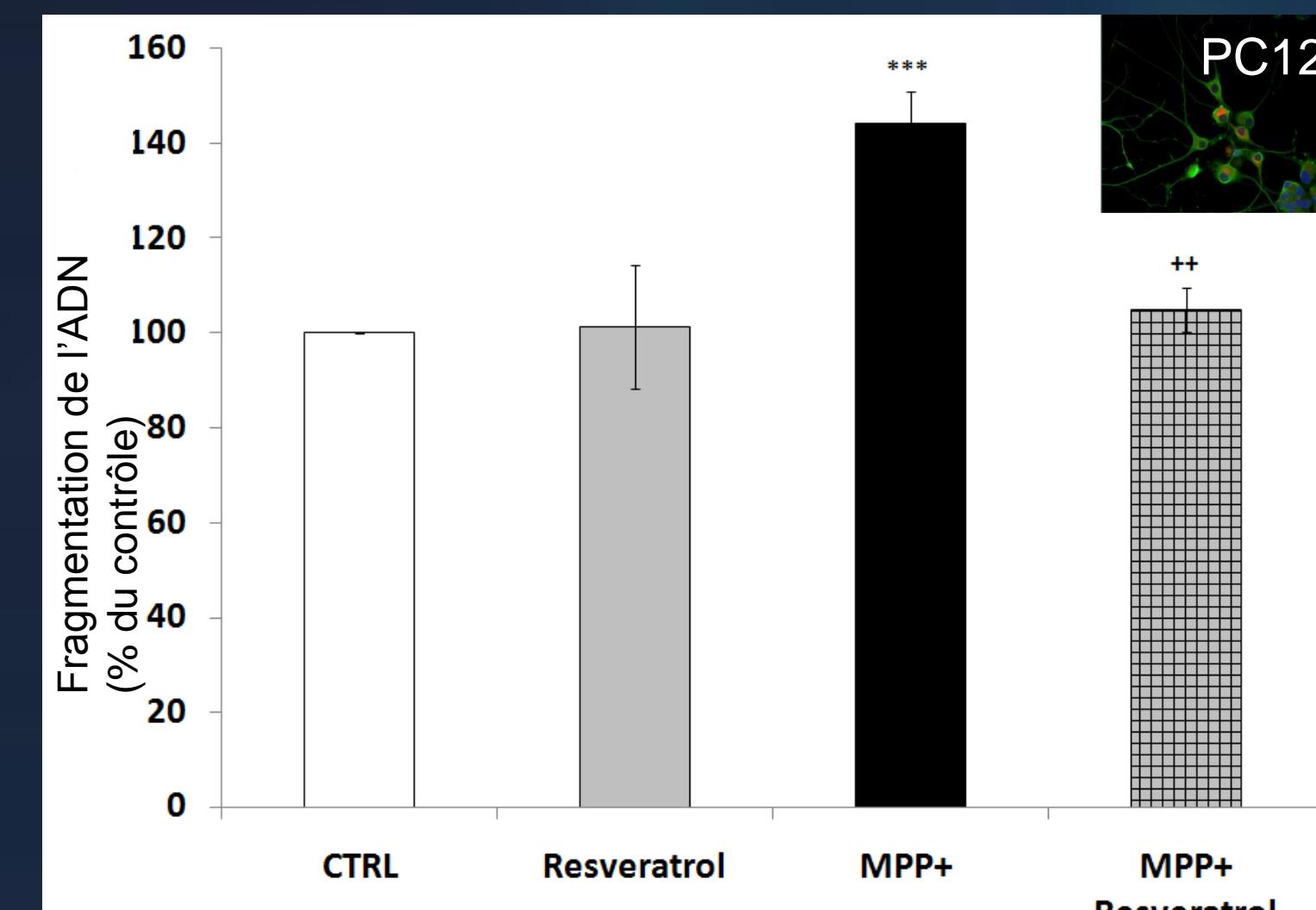


Figure 9. Effet du resvératrol sur l'apoptose chez des neurones. Le resvératrol possède des propriétés anti-apoptotiques du fait qu'il réduit de 40% la fragmentation d'ADN neuronal induite par le MPP+.

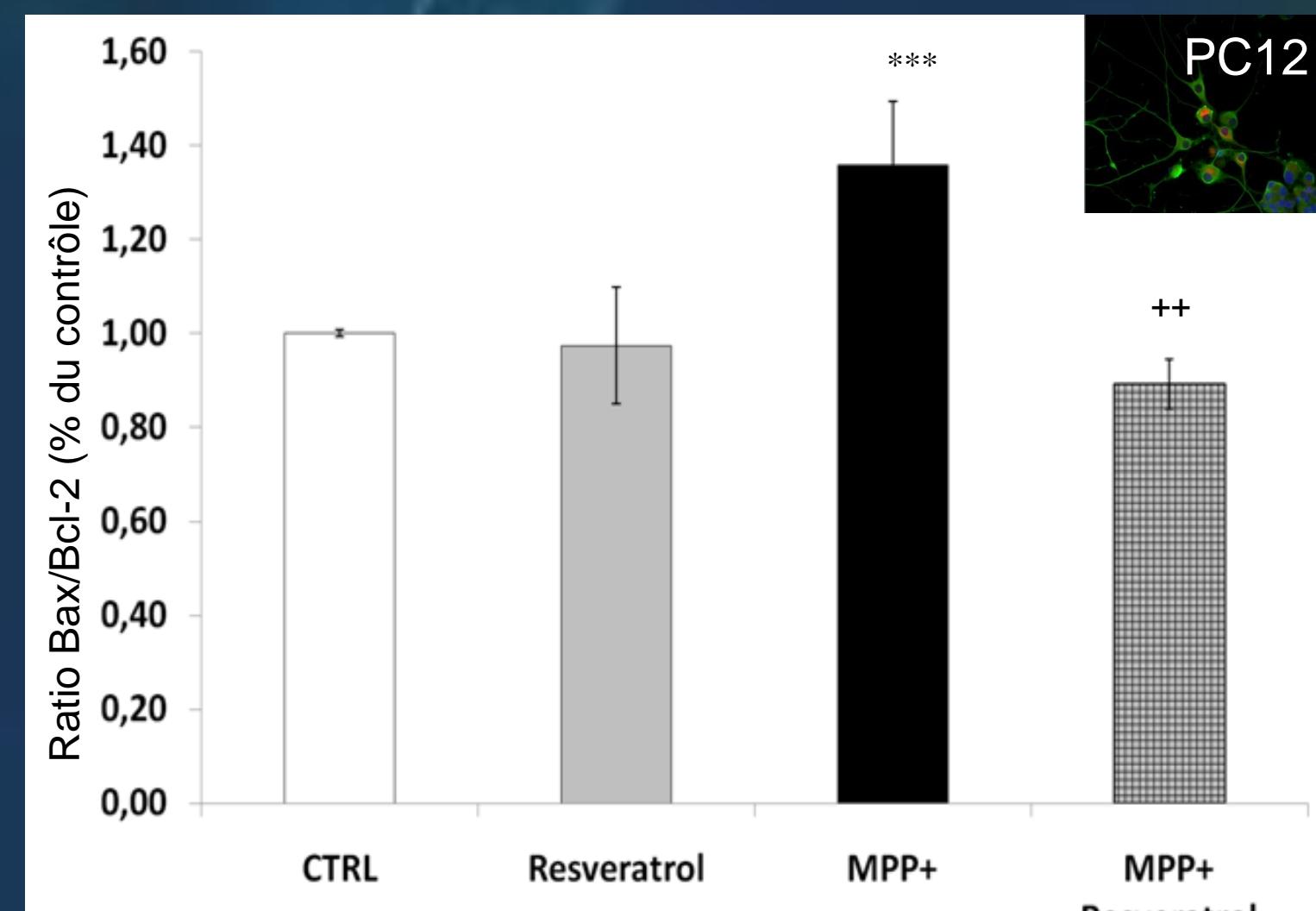


Figure 10. Effet du resvératrol sur le ratio Bax/Bcl-2 chez des neurones. Nos résultats démontrent que le resvératrol a des propriétés anti-apoptotiques, car il inhibe l'homodimérisation de Bax.

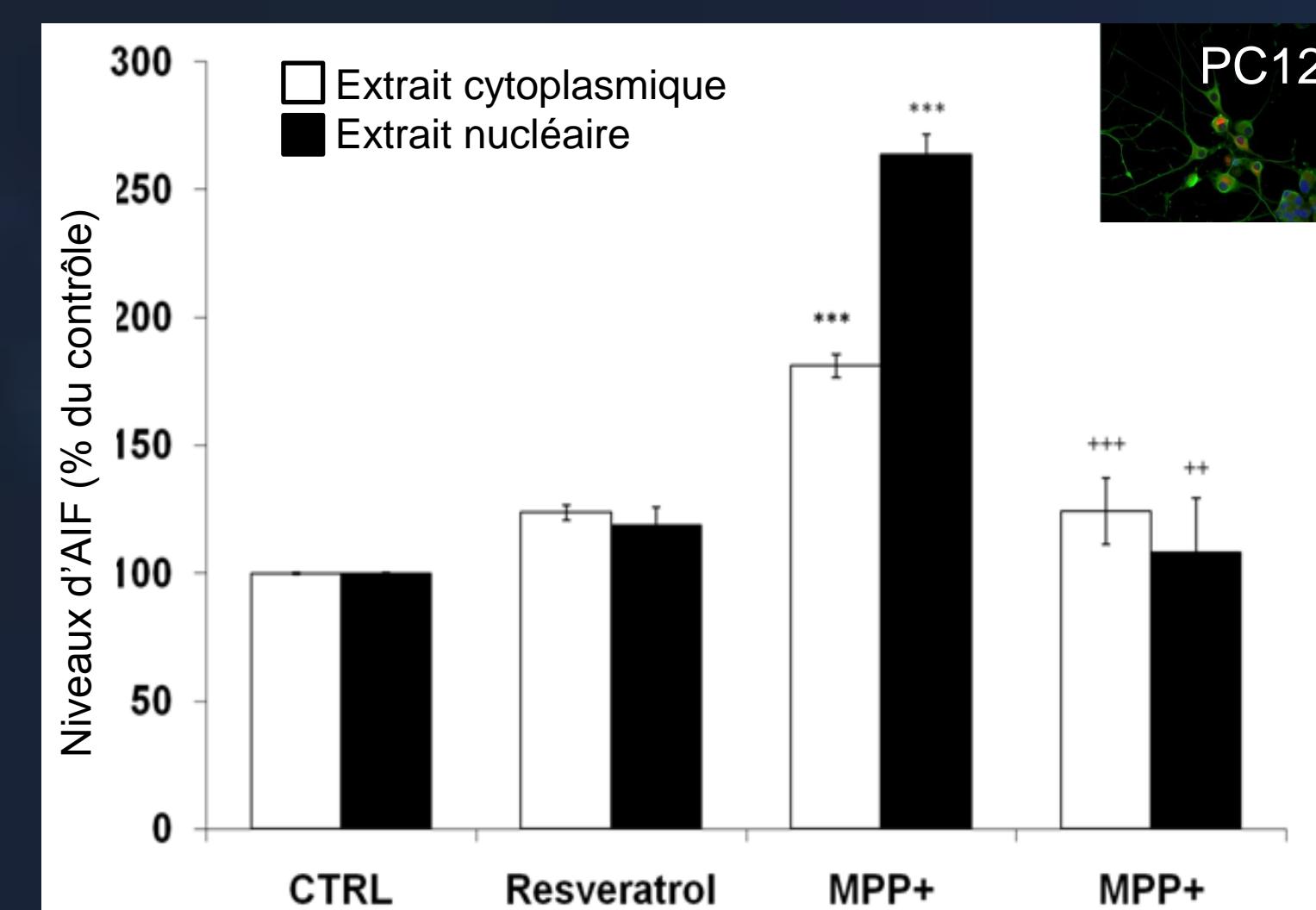


Figure 11. Effet du resvératrol sur les niveaux d'AIF nucléaire chez des neurones. Le resvératrol est anti-apoptotique, car il diminue la translocation d'AIF vers le noyau de neurones de 150%.

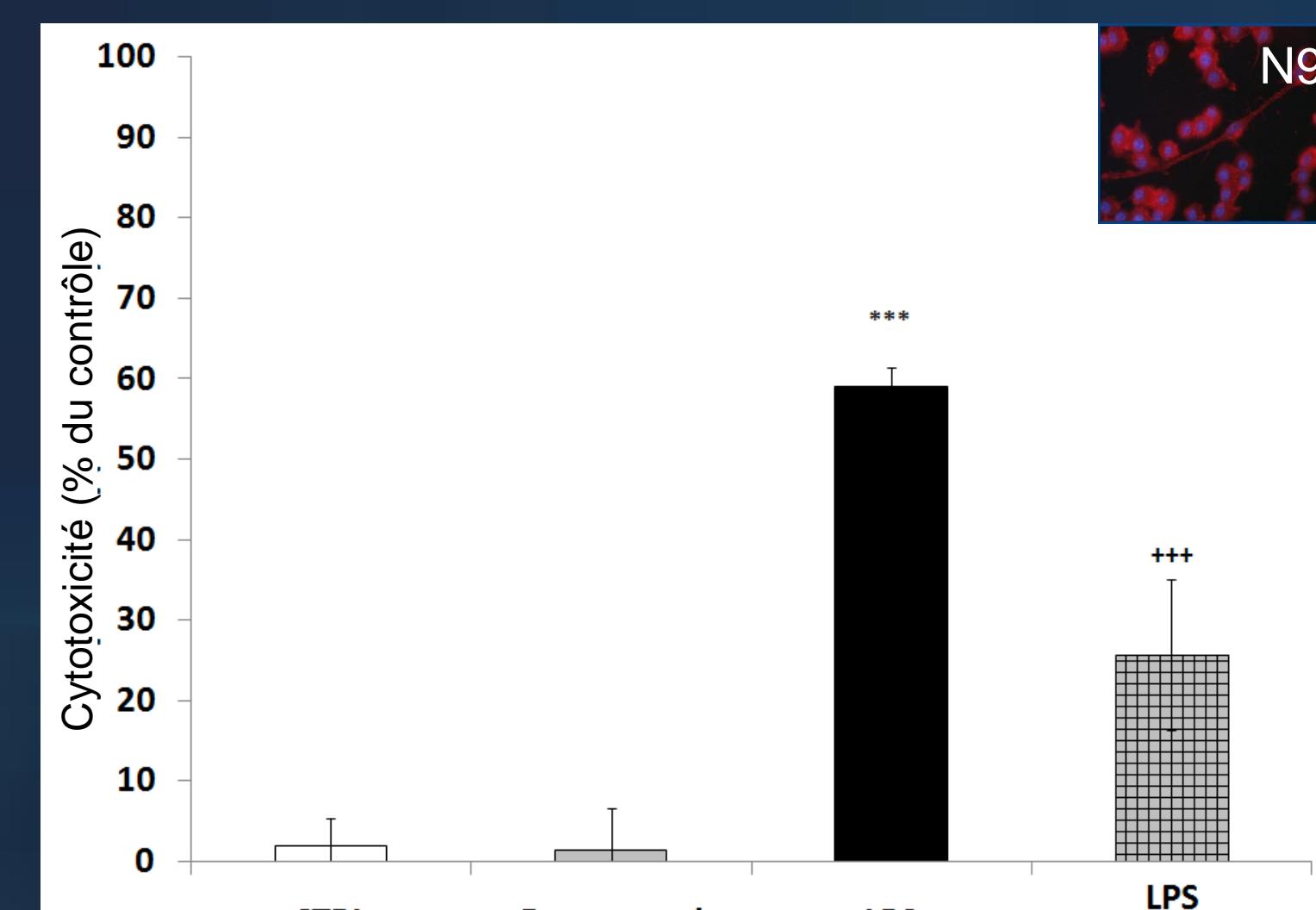


Figure 12. Effet du resvératrol sur la cytotoxicité chez les microglies. Nos résultats montrent que le resvératrol a des propriétés anti-inflammatoires, car il réduit de 30% la mort gliale induite par le LPS.

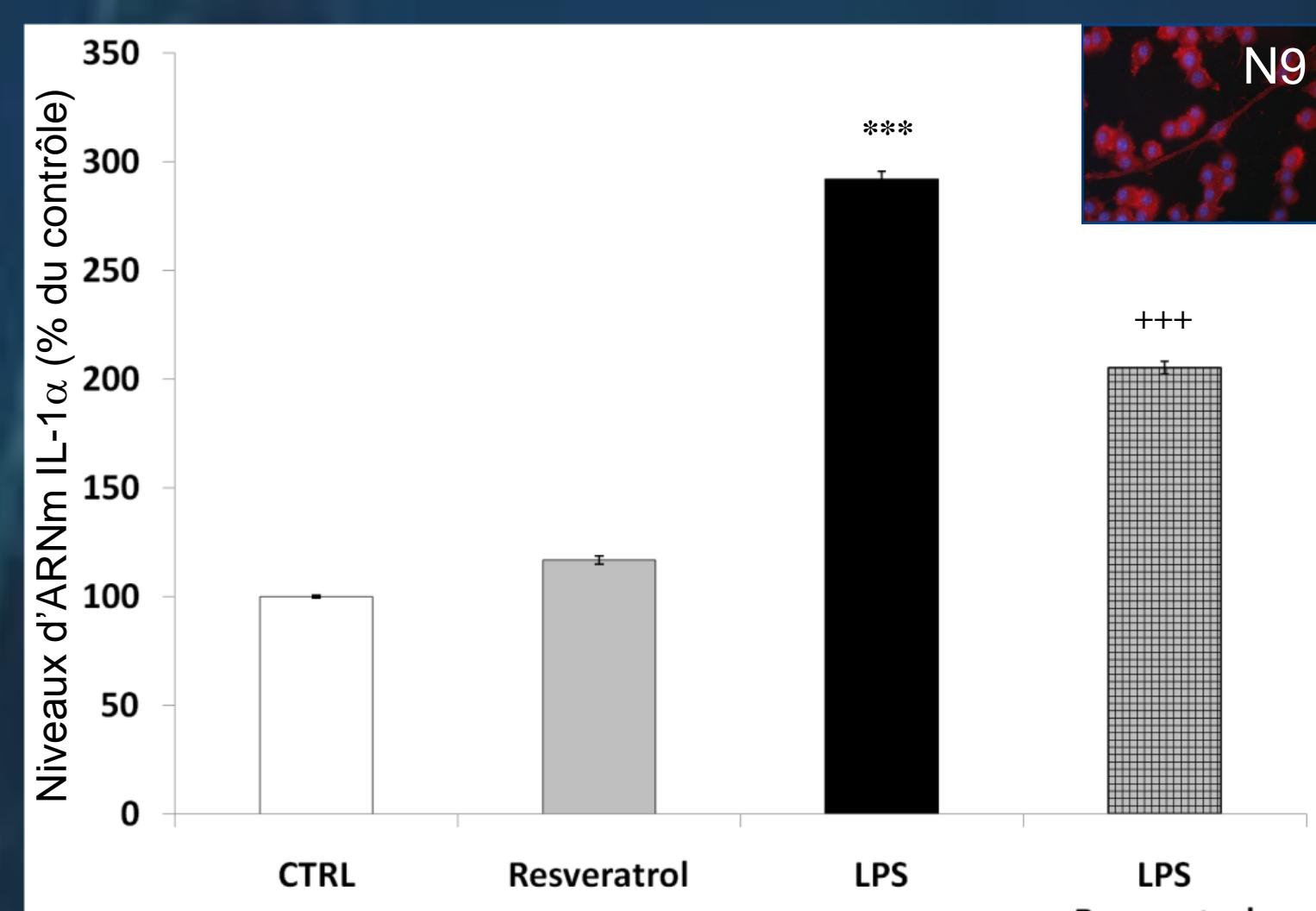


Figure 13. Effet du resvératrol sur les niveaux d'ARNm IL-1 $\alpha$  chez les microglies. Le resvératrol possède des propriétés anti-inflammatoires du fait qu'il réduit de 100% la transcription d'IL-1 $\alpha$  gliale.

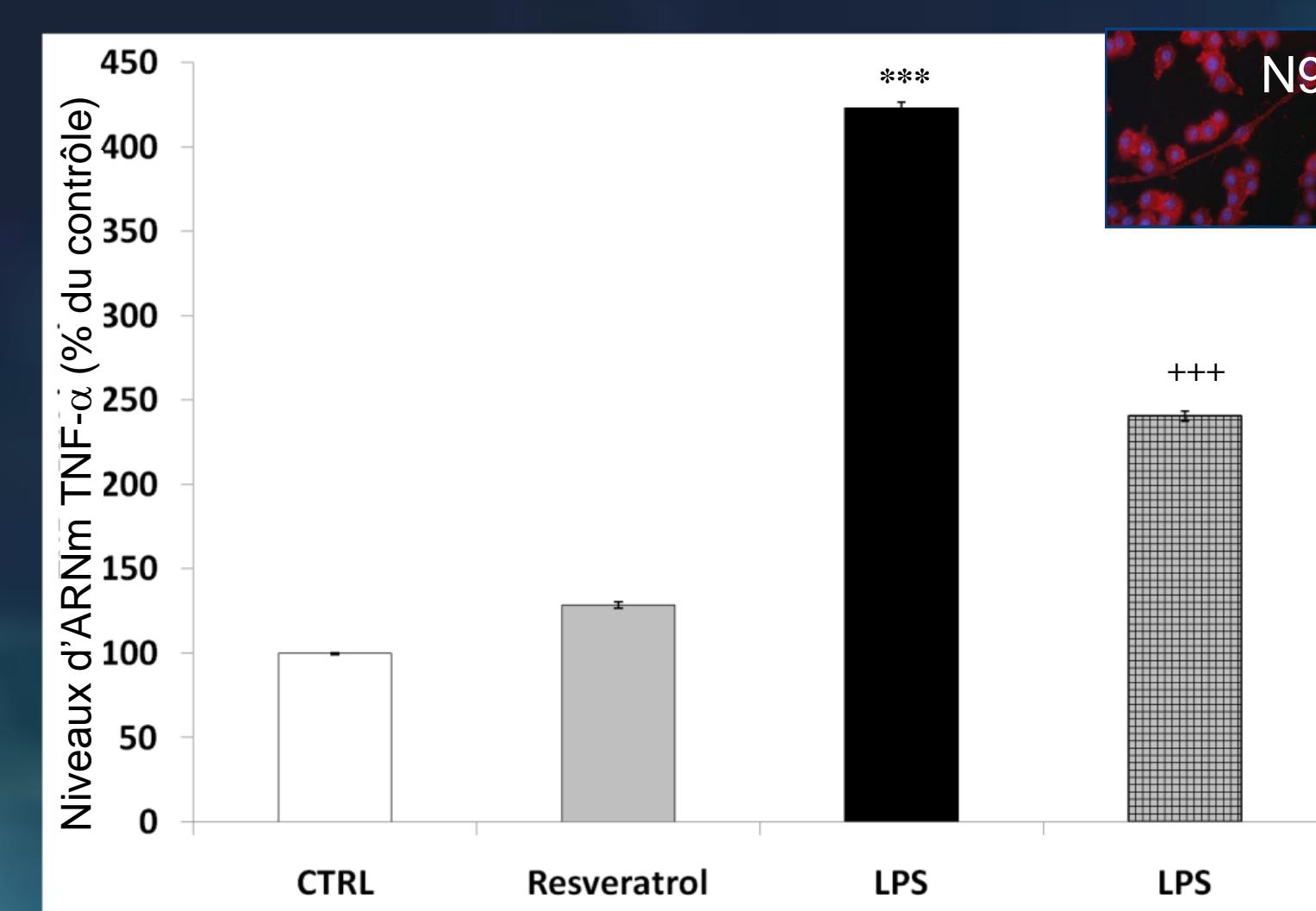


Figure 14. Effet du resvératrol sur les niveaux d'ARNm TNF- $\alpha$  chez les microglies. Le resvératrol est un neuroprotecteur efficace, car il diminue de 150% la transcription de TNF- $\alpha$  gliale.

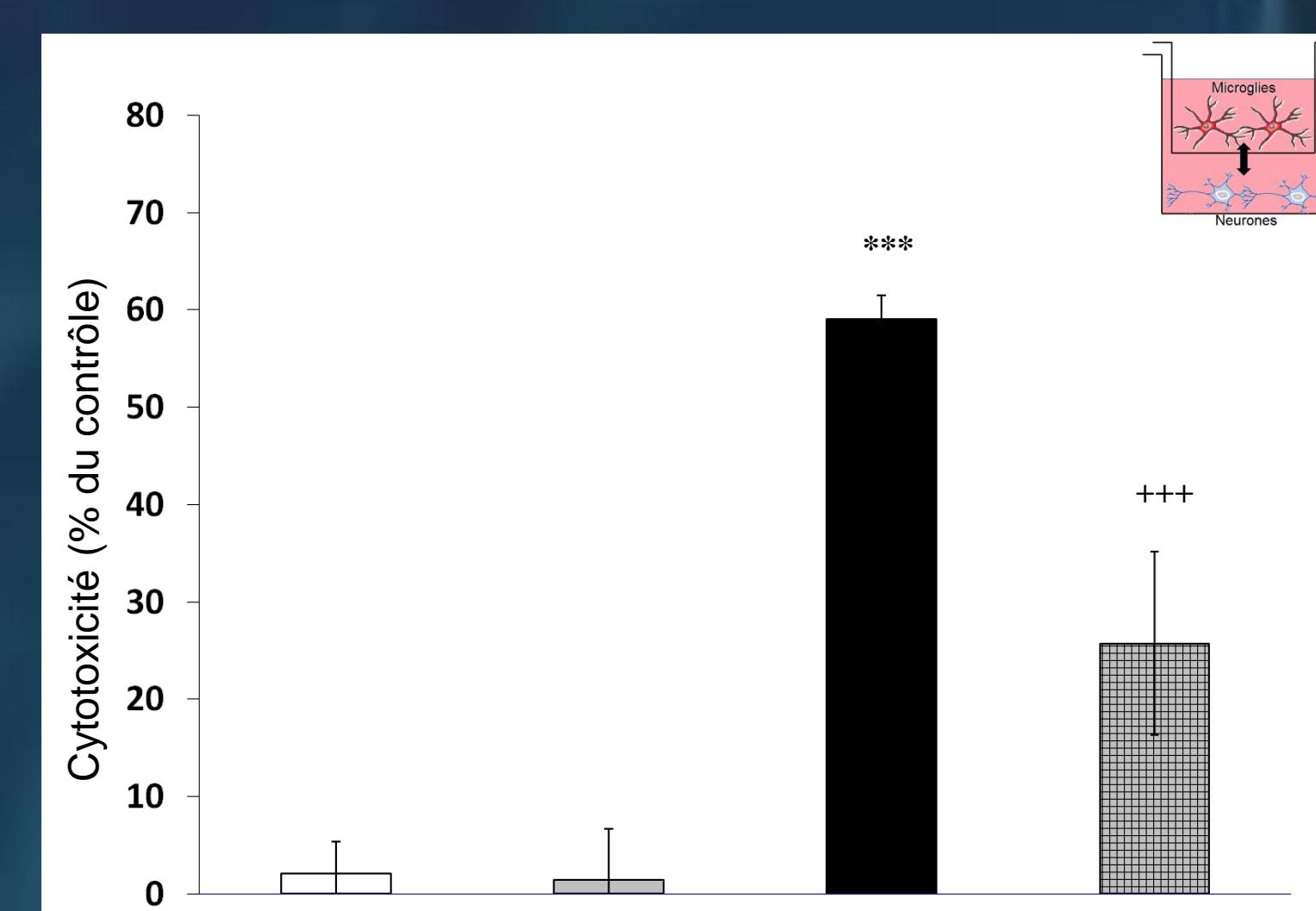


Figure 15. Effet du resvératrol sur la cytotoxicité chez les neurones en co-culture. Le resvératrol est anti-apoptotique, car il prévient divers processus de l'apoptose neuronale induits par les microglies activées au LPS.

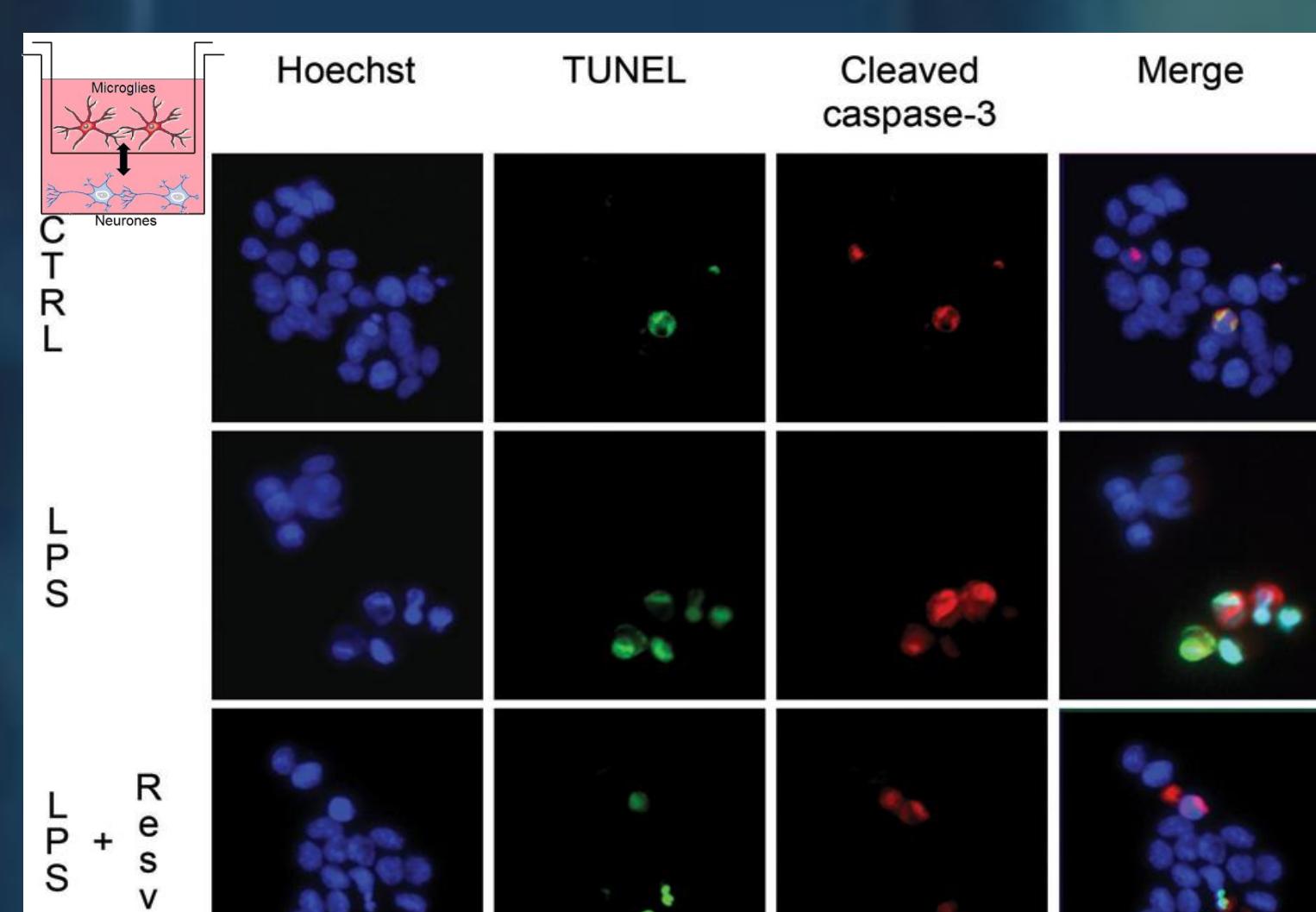


Figure 16. Effet du resvératrol sur l'apoptose chez les neurones en co-culture. Le resvératrol est anti-apoptotique, car il prévient divers processus de l'apoptose neuronale induits par les microglies activées au LPS.

## CONCLUSION

Nos résultats démontrent que l'administration du resvératrol à des cellules neuronales traitées au MPP+ diminue de manière significative l'apoptose et la cytotoxicité, réduit l'expression de gènes pro-apoptotiques tel Bax et augmente celle de gènes anti-apoptotiques, tel Bcl-2. De plus, le resvératrol réduit la transcription des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$  et TNF- $\alpha$  chez les microglies activées au LPS et diminue l'apoptose des cellules neuronales induite par les cellules gliales activées dans un système de co-culture. Ces résultats sont d'une importance capitale pour élaborer des stratégies de prévention des maladies neurodégénératives et ouvrent la voie vers la recherche de molécules naturelles thérapeutiquement efficaces.