

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

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

PAR
JULIE BOURNIVAL

MÉCANISMES D'ACTION ANTI-APOPTOTIQUE DE DEUX POLYPHÉNOLS
NATURELS, LE RESVÉRATROL ET LA QUERCÉTINE,
SUR DES CELLULES NEURONALES EN CULTURE

MAI 2009

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

AVANT-PROPOS

Ce présent mémoire témoigne du fruit de mes études de deuxième cycle en biophysique et biologie cellulaires. J'ai effectué mon travail de recherche dans le laboratoire de neurobiologie cellulaire de la Dre Martinoli. Je profite de ces premières lignes pour remercier tous ceux qui ont contribué à l'accomplissement de mon projet de recherche.

Tout d'abord, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, la professeure Maria-Grazia Martinoli. Je vous remercie grandement de m'avoir accordé votre confiance dès le début, c'est-à-dire lors de mon stage de fin de technique en chimie-biologie du Collège Shawinigan. Mes premiers pas dans l'univers de la recherche ont été facilités par tous vos conseils. Vous m'avez toujours offert la liberté de décision dans le développement de mon projet et je vous en suis fortement reconnaissante. Ainsi, j'ai pu développer ma capacité d'analyse scientifique et ma débrouillardise. Je porte aussi une attention toute particulière à Fanny Longpré, assistante de recherche du laboratoire et amie. Je te remercie tout particulièrement pour tous tes conseils et ton amitié sincère.

Mes remerciements s'adressent aussi à mon amie et collègue de laboratoire Vicky Lahaie-Collins. Merci à toi pour ton amitié qui persiste depuis maintenant 7 ans! Tu es une amie extraordinaire et une collègue de travail de confiance. À tous nos prochains petits soupers. Je remercie aussi mes anciens et nouveaux collègues de travail : Keith Chiasson, Geneviève Bureau, Cindy Tremblay, Marilyn Plouffe et Julie Carange. À vous, merci pour votre soutien quotidien et les beaux moments passés au laboratoire.

À mes parents, qui ont toujours été présents, et qui ont toujours eu confiance en moi.

Simon, merci de m'encourager, de me soutenir, de m'aimer. Ton amour est une source d'inspiration qui remplit mon cœur de joie. Finalement, à toi Thomas, mon petit homme qui m'étonne un peu plus chaque jour. Merci pour tous les beaux moments que tu me donnes. Je t'aime!

RÉSUMÉ

La maladie de Parkinson est définie comme un déficit dopaminergique progressif au niveau du corps strié, résultant principalement de la dégénérescence de la voie nigrostriée. Cette voie dopaminergique contrôle une partie du système musculaire volontaire et un dysfonctionnement de cette voie conduit à des symptômes moteurs caractéristiques de la maladie. Les symptômes cliniques cardinaux sont la perte de mobilité, la rigidité musculaire et la difficulté à initier un mouvement volontaire. L'étiologie de la maladie est inconnue jusqu'à présent. Même s'il existe des traitements symptomatiques, ils ne sont efficaces que sur une courte durée et ils causent plusieurs effets secondaires. Des études antérieures de notre laboratoire ont démontré le pouvoir antioxydant des polyphénols et plus particulièrement celui du resvératrol et de la quercétine. Mon travail de recherche s'est concentré sur l'étude du potentiel anti-apoptotique de ces deux molécules naturellement retrouvées dans notre alimentation, et ce en vérifiant leur potentiel à diminuer la mort apoptotique neuronale induite par un stress oxydant. De plus, la seconde avenue de mon projet était de vérifier l'impact de l'utilisation de ces polyphénols sur les mécanismes cellulaires impliqués dans la protection, par le resvératrol et la quercétine, de l'apoptose induite par une toxine oxydante, le MPP+. Dans ce mémoire, il sera donc question de la maladie de Parkinson ainsi que du phénomène de stress oxydant pour permettre une bonne compréhension de mes résultats. Mes résultats ont permis de conclure que le resvératrol et la quercétine permettent de diminuer la mort apoptotique induite par une toxine oxydante en modulant des composants précis de la cascade apoptotique. Ainsi, un traitement avec des polyphénols pourrait servir de traitement préventif pour la maladie de Parkinson ou même de traitement combiné aux traitements actuels. Ceci permettrait d'améliorer leur efficacité et tout particulièrement, la qualité de vie des patients.

Mots-clés : Maladie de Parkinson, resvératrol, quercétine, apoptose.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	x
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 La maladie de Parkinson (MP).....	1
1.1.1 Prévalence et incidence de la MP.....	1
1.1.2 Les symptômes moteurs.....	3
1.1.3 Les symptômes non-moteurs	3
1.1.4 Neurophysiologie de la MP.....	4
1.1.5 Pathophysiologie de la MP	6
1.1.5.1 Perte de la pigmentation de la SNc.....	6
1.1.5.2 Présence de CL	7
1.2 Les causes de la MP.....	8
1.2.1 La MP héréditaire	8
1.2.2 La MP idiopathique.....	13
1.2.2.1 Le stress oxydant	13
1.2.2.2 Les défenses antioxydantes de l'organisme.....	18
1.2.2.3 Les altérations de la MP qui favorisent le stress oxydant.....	21
1.2.2.4 La résultante du stress oxydant : l'apoptose.....	25
1.2.2.5 Le stress oxydant reproduit expérimentalement par le MPTP et son métabolite actif (MPP ⁺)	29
1.2.2.6 L'inflammation et la MP.....	30
1.3 Les thérapies et traitements de la MP	32
1.3.1 Les traitements chirurgicaux.....	32
1.3.2 Les traitements médicamenteux.....	34
1.3.3 Les nouvelles avenues	35
1.3.3.1 Les estrogènes	36
1.3.3.2 Le resvératrol.....	41
1.3.3.3 La quercétine	47
1.4 Objectifs de recherche.....	50

CHAPITRE 2	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	52
2.1	Présentation de la lignée cellulaire PC12	52
2.2	Influence du resvératrol et de la quercétine sur la mort apoptotique induite par une neurotoxine : le MPP ⁺	53
2.3	Mécanismes cellulaires impliqués dans la protection, par le resvératrol et la quercétine, de l'apoptose induite par le MPP ⁺	57
2.4	Analyse statistique	59
CHAPITRE 3	RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	60
3.1	Détermination des concentrations de resvératrol et de quercétine à utiliser lors des différents tests.	60
3.2	Détermination de la concentration de MPP ⁺ pour l'induction de l'apoptose.	60
3.3	Effet du resvératrol sur la lignée cellulaire PC12 naïves (de phénotype cancéreux).	61
3.4	Vérification de la séparation des protéines cytoplasmiques- mitochondriales et des protéines cytoplasmiques-nucléaires.....	62
CHAPITRE 4	ARTICLE.....	64
4.1	Ma contribution au travail de recherche	64
4.2	Résumé de l'article en français	64
4.3	Protective effects of resveratrol and quercetin against apoptotic death in dopaminergic neurons	65
CHAPITRE 5	CONCLUSION	95
BIBLIOGRAPHIE	99

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des trois gènes.....	58
---	----

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 : Incidence de la MP chez les hommes et les femmes dans différents groupes d'âge.....	2
FIGURE 1.2 : Marquage à la F-Dopa en tomographie par émission de positons chez un sujet sain (à droite) et chez un patient parkinsonien (à gauche).....	4
FIGURE 1.3 : Schématisation de la nigro-striée fonctionnelle	5
FIGURE 1.4 : Schématisation de la disproportion des relations entre les différentes structures corticales chez un patient parkinsonien	5
FIGURE 1.5 : Représentation schématique de la voie nigro-striée et de la pigmentation de la substance noire. A) Pigmentation normale chez un individu sain et B) Perte de la pigmentation neuromélanique chez un patient parkinsonien.....	7
FIGURE 1.6 : Détection immunohistochimique des CL dans les neurones dopaminergiques. Marquage avec un anticorps de l' α -synucléine et de l'ubiquitine	8
FIGURE 1.7 : Le rôle de l' α -synucléine et du stockage de la DA.....	10
FIGURE 1.8 : Résumé des différents gènes mutés dans la MP.....	12
FIGURE 1.9 : Représentation schématique du déséquilibre entre les ROS causant le stress oxydant et les défenses antioxydantes du corps	14
FIGURE 1.10 : Différents métabolismes de la DA menant à la formation d'espèces toxiques à la cellule.....	15
FIGURE 1.11 : Réaction d'auto-oxydation de la DA.....	15
FIGURE 1.12 : Biochimie du NO menant à la formation de l'ion ONOO^-	16
FIGURE 1.13 : Mécanisme de formation des produits d'oxydation de la base azotée guanine.....	18
FIGURE 1.14 : Formes variées de la vitamine C et sa réaction avec le RL	20
FIGURE 1.15 : Voie de signalisation de différents antioxydants : la vitamine C, E et la GSH.....	20
FIGURE 1.16 : Métabolisme normal de la DA ainsi que le métabolisme altéré lors de la MP	24

FIGURE 1.17 : Résumé des sources de radicaux libres et des défenses antioxydantes de la cellule	25
FIGURE 1.18 : Schéma des voies intracellulaires de la mort cellulaire programmée	27
FIGURE 1.19 : Mise en évidence de la relâche d'AIF de la mitochondrie vers le noyau suite à la perturbation du potentiel mitochondrial.	28
FIGURE 1.20 : Étape finale de l'apoptose : la fragmentation de l'ADN.	28
FIGURE 1.21 : A) Représentation schématique du métabolisme du MPTP et B) Mécanismes d'action intracellulaire du MPP ⁺	30
FIGURE 1.22 : Schéma simplifiée de l'interaction entre la microglie et le neurone dopaminergique.....	31
FIGURE 1.23 : Représentation d'un module régulateur utilisé dans la SPC.	33
FIGURE 1.24 : Formation de la DA à partir de la L-dopa.	34
FIGURE 1.25 : Utilisation des produits naturels en tant que médecine complémentaire ou alternative	36
FIGURE 1.26 : Structure du 17 β -estradiol et de différents structures analogues	37
FIGURE 1.27 : Modèle simplifié du mode d'action de l'estradiol par A) la voie classique et B) la voie non-classique	38
FIGURE 1.28 : Séquence génomique du ER α et du ER β	39
FIGURE 1.29: Résumé des différents mécanismes de protection de l'estradiol	40
FIGURE 1.30 : Nombre de citations incluant le resvératrol sur Pubmed en fonction du temps	42
FIGURE 1.31 : Structure <i>cis</i> et <i>trans</i> -resvératrol.	42
FIGURE 1.32 : Voies impliquées dans l'induction de l'apoptose par le resvératrol	44
FIGURE 1.33 : Effet du resvératrol sur le système enzymatique impliqué dans la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires.....	46
FIGURE 1.34 : Structure de la quercétine.....	47
FIGURE 1.35 : Sommaire du métabolisme cellulaire de la quercétine et de ses dérivés méthylés	48

FIGURE 1.36: Analyse de la baisse d'absorbance à 515 nm de la solution de DPPH en présence de quercétine et du complexe Cu-quercétine	49
FIGURE 2.1 : Représentation des cellules PC12 non-différenciées et des cellules PC12 différenciées	53
FIGURE 2.2: Stratégie pour l'élaboration des traitements de cellules.....	54
FIGURE 2.3 : La technique d'ajout de dUTP dans la technique de TUNEL.....	55
FIGURE 3.1 : Induction de l'apoptose par 500 μ M de MPP ⁺	61
FIGURE 3.2 : Induction de l'apoptose par 500 μ M de MPP ⁺ et effet non-protecteur du resvératrol	62
FIGURE 3.3 : Résultats de la bonne séparation des protéines cytoplasmiques et mitochondriales.	63
FIGURE 3.4 : Résultats de la bonne séparation des protéines cytoplasmiques et nucléaires.....	63

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

ADNss	ADN simple brin
AIF	Facteur inducteur d'apoptose
ARN _m	ARN messager
BHE	Barrière hémato-encéphalique
Cat	Catalase
CL	Corps de Lewy
CytC	Cytochrome <i>c</i>
COX-2	Cyclooxygénase-2
DA	Dopamine
DAT	Transporteur de la dopamine
DOPAC	Acide 3,4 dihydrophenylacétique
ER α	Récepteurs estrogéniques alpha
ER β	Récepteurs estrogéniques bêta
ERE	Éléments de réponse estrogénique
FBS	Sérum bovin foetal
GPI	Globus pallidus interne
GPx	Gluthatione peroxydase
GSH	Gluthatione totale
HDAC	Histone déacétylase
HNE	4-hydroxynonéal
HS	Sérum de cheval
iNOS	Synthétase d'oxyde nitrique inductible
L-dopa	Lévodopa
LPS	Lipopolysaccharide
MAO	Monoamine oxydase
MDA	Malondialdéhyde
MPDP	1-méthyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridium
MP	Maladie de Parkinson
MPP ⁺	1-méthyl-4-phénylpyridinium

MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,5,6-tétrahydropyridine
NGF	Facteur de croissance du nerf
NM	Neuromélanine
NO	Oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrique synthétase
$O_2^{\bullet -}$	Radical superoxide
6-OHDA	6 hydroxydopamine
$ONOO^-$	Peroxynitrite
OH^\bullet	Radical hydroxyle
PARP	Poly (ADN-ribose) polymérase
PGE2	Prostaglandines E2
PLD2	Phospholipase D2
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
RL	Radicaux libres
RNS	Espèces azotées réactives
ROS	Espèces oxygénées réactives
SNc	Substance noire compacte
SOD	Superoxide dismutase
SPC	Stimulation profonde du cerveau
T	Traitement
Tdt	Transférase de déoxynucléotides terminaux
TH	Tyrosine hydroxylase
TNF- α	Facteur de croissance tumorale α
TRE	Thérapie de remplacement des estrogènes
TUNEL	Terminal dUTP nicked-end labelling
VDAC	Canal anionique dépendant du voltage

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 La maladie de Parkinson (MP)

En 1817, un médecin britannique a publié un ouvrage intitulé «Essay on the Shaking Palsy». Dans cet essai court, James Parkinson a réussi, grâce à l'observation de six patients, l'énoncé des traits caractéristiques de la maladie : posture légèrement courbée vers l'avant, tremblement au repos et démarche difficile. Cette maladie fut nommée comme la «paralysie agitante». Plus tard, Jean-Marc Charcot, un médecin parisien, a ajouté la rigidité à la description clinique offerte par Parkinson et il a qualifié la maladie plus spécifiquement de «maladie de Parkinson». Cependant, ce n'est que plusieurs années plus tard que la dégénérescence des neurones de la substance noire *pars compacta* et par conséquent le déficit en dopamine (DA) ont été associés spécifiquement à la maladie. En 1960, une équipe de Vienne, formée des chercheurs Ehringer et Hornykiewicz ont spécifiquement associé le déficit en DA dans le striatum à ce trouble neurologique dans 6 cas idiopathiques (Ehringer and Hornykiewicz, 1960). Depuis, de nombreuses études ont ajouté des précisions quant à la description de la maladie, ses symptômes et les traitements, mais la cause n'en demeure pas moins toujours inconnue.

1.1.1 Prévalence et incidence de la MP

La MP est le deuxième trouble neurologique le plus commun après la maladie d'Alzheimer. Cette maladie affecte 0.5 à 1 % de la population entre 65-69 ans et cette incidence augmente de 1 à 3% pour les personnes âgées de 80 ans et plus. De plus, 85% des nouveaux cas sont diagnostiqués chez des gens âgés de 65 ans et plus. (de Lau and Breteler, 2006). L'incidence de la MP est beaucoup plus grande chez les hommes que chez les femmes (Shulman, 2007). La figure

1.1 représente bien l'évolution de l'incidence de la MP en fonction de différentes tranches d'âge. La différence entre les groupes devient plus prononcée dans la tranche 75 à 84 ans. Cependant, on retrouve une chute drastique du nombre de cas de la MP entre les hommes et les femmes chez le groupe d'âge de 85 ans et plus. Ce phénomène s'explique tout simplement par la mort des sujets qui influent les analyses.

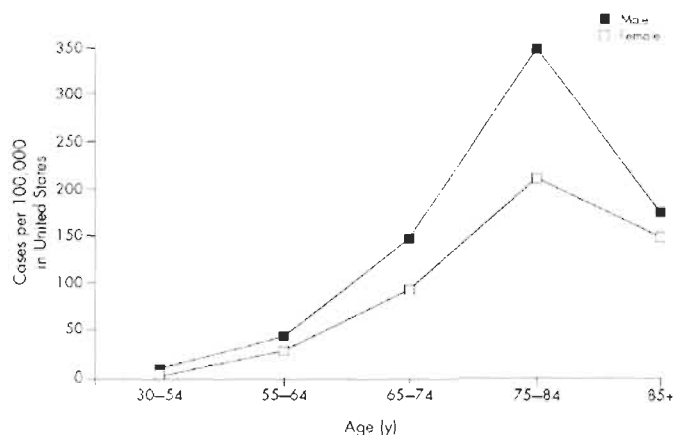


FIGURE 1.1 : Incidence de la MP chez les hommes et les femmes dans différents groupes d'âge. (Shulman, 2007).

Des études *in vitro* et cliniques tendent à prédire un effet neuroprotecteur de l'estrogène (Wooten et al., 2004). La race des individus influe aussi sur le nombre de cas de la MP. Selon différentes considérations géographiques, c'est en Chine que la prévalence de la MP est la plus forte, tandis que l'incidence la plus forte se retrouverait en Italie (Rajput and Birdi, 1997). Les études épidémiologiques mènent à suspecter l'environnement comme un facteur de risque à la maladie. En effet, l'incidence de la maladie est en hausse chez les gens habitant en milieu rural, consommant l'eau de puits et en contact avec les pesticides et insecticides (Bonnet and Houeto, 1999). Aussi, il semblerait que les gens atteints du diabète de type 2 ainsi que ceux ayant subi un traumatisme crânien sont plus à risque de développer la MP (Vanitallie, 2008).

1.1.2 Les symptômes moteurs

La MP se manifeste par 4 symptômes cardinaux moteurs. L'auteur Pierre Pollak a réussi à bien les décrire dans son ouvrage intitulé «La maladie de Parkinson» (Pollak, 2004). Il s'agit (1) de tremblements au repos, (2) de bradykinésies, (3) de rigidité musculaire et (4) d'instabilité posturale. Ces signes moteurs ne se manifestent pas dans les mêmes proportions chez les patients. Les **tremblements au repos** sont souvent annonciateurs de la maladie. Ils ont le plus souvent siège aux membres supérieurs et plus souvent aux mains et aux bras. Comparativement à nos croyances populaires, les tremblements de la tête qui semblent dire non en permanence, ne sont pas descriptifs d'un patient parkinsonien. Les tremblements peuvent aussi survenir aux membres inférieurs comme les jambes, pieds et orteils. Les **bradykinésies** affectent 80 à 90% des patients atteints de la MP. Il s'agit de lenteur dans l'exécution des mouvements. Ce symptôme se traduit dans la vie courante du patient par la difficulté à se tourner dans son lit ou même à se lever d'une chaise. La **rigidité** musculaire est un symptôme à part entière présent chez plus de 90% des patients et qui contribue au ralentissement du mouvement. En définitive, la rigidité musculaire peut mener à la perte d'expression faciale. L'**instabilité posturale** est le dernier symptôme à apparaître et il reflète que la maladie progresse vers un stade avancé. C'est une prédisposition certaine aux chutes avec blessures (Weintraub et al., 2008).

1.1.3 Les symptômes non-moteurs

En plus des symptômes moteurs caractéristiques de la maladie, une série de symptômes peut incommoder le malade parkinsonien. Certains apparaissent dès le début, mais d'autres à des stades beaucoup plus avancés. Sommairement, il s'agit de troubles digestifs, cutanés, vasculaires et psychiques (Weintraub et al., 2008).

1.1.4 Neurophysiologie de la MP

La MP est caractérisée par une dégénérescence progressive des neurones contenant de la DA, principalement localisés dans la substance noire compacte (SNc) du mésencéphale, et qui projettent vers le striatum. La déficience en DA affecte la voie nigro-striée, une boucle de rétroaction qui régit les mouvements volontaires. Les figures 1.2 et 1.3 présentent le déficit en DA chez un patient parkinsonien et deuxièmement, la voie nigro-striée fonctionnelle.

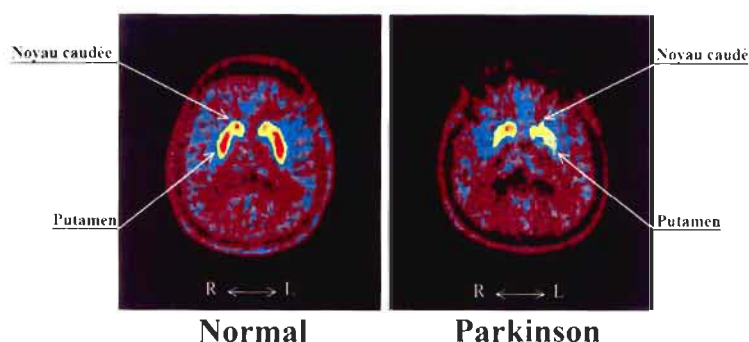


FIGURE 1.2 : Marquage à la F-Dopa en tomographie par émission de positons chez un sujet sain (à droite) et chez un patient parkinsonien (à gauche) (Thobois et al., 2001).

Chez un individu sain, les neurones dopaminergiques se projettent massivement vers le striatum, constitué du noyau caudé et du putamen, et ils innervent les neurones possédant les récepteurs à DA (figure 1.2). Une série d'interactions subséquentes mène finalement à l'innervation des cellules musculaires. Au cours de la MP, les lésions dopaminergiques affectant la voie directe entraînent une désinhibition du globus pallidus interne (GPi). Le résultat de cette altération renforce l'inhibition du globus pallidus sur le thalamus, ce qui atténue d'autant l'excitation que le cortex peut recevoir du thalamus. En définitive, il en résulte une diminution des mouvements volontaires. La figure 1.4 démontre les relations défailtantes dans le cadre de la MP.

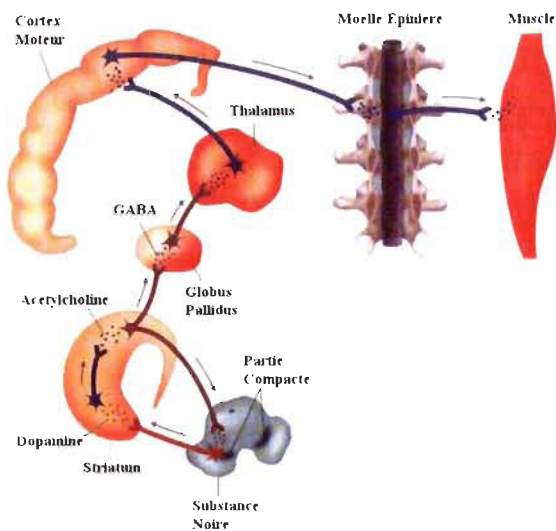


FIGURE 1.3 : Schématisation de la nigro-strie fonctionnelle (Youdim and Riederer, 1997).

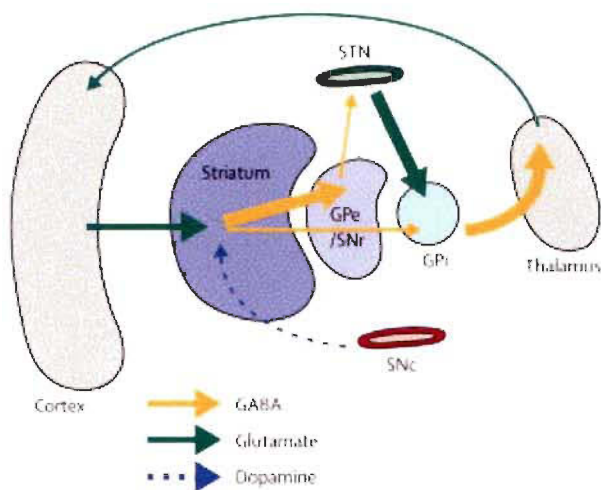


FIGURE 1.4 : Schématisation de la disproportion des relations entre les différentes structures corticales chez un patient parkinsonien (Burch and Sheerin, 2005).

Cette dernière figure représente d'une façon plus complexe les relations altérées chez un patient parkinsonien. Ces altérations découlent de la dégénérescence des neurones dopaminergiques et il faut s'imaginer que cette situation est complètement irréversible. Les premiers symptômes de la maladie apparaissent lorsque plus de 50% des neurones sont affectés (Dauer and Przedborski, 2003).

1.1.5 Pathophysiologie de la MP

Le diagnostic de la maladie est établi sur la base des symptômes. En fait, le malade doit présenter des bradykinésies et un des trois autres symptômes mentionnés précédemment (Weintraub et al., 2008). Il n'en demeure pas moins que le diagnostic officiel s'effectue essentiellement à la mort du patient parkinsonien. La dégénérescence des neurones dopaminergiques mènent à la dépigmentation de la SNc et à la diminution radicale de DA dans le striatum (Jenner and Olanow, 2006; McNaught and Olanow, 2006). La présence d'inclusions cytoplasmiques est aussi reconnue comme un trait pathologique majeur de la MP, désignées sous le nom de « Corps de Lewy » (CL).

1.1.5.1 Perte de la pigmentation de la SNc

La pigmentation de la SNc lui est conférée par la présence de la neuromélanine (NM). Initialement, les chercheurs découvrirent la présence de granules pigmentées dans le système nerveux central (Schrerer, 1939), et ce n'est que quelques années plus tard que les études associèrent ces granules avec la mélanine par leurs caractéristiques chimiques semblables (Van Woert et al., 1967). Il s'agit de leur insolubilité dans les solvants organiques, le blanchiment au peroxyde d'hydrogène et leur spectre électromagnétique. Ce pigment fut par la suite nommé, NM (Cotzias et al., 1964; Graham, 1979). La NM serait possiblement associée avec la vulnérabilité des neurones dopaminergiques de la SN (Cotzias et al., 1964; Kastner et al., 1992). Dans les études histologiques, ce pigment apparaît vers l'âge de 2 ou 3 ans et il s'accumule en vieillissant (Cowen, 1986). La NM est principalement composée de mélanine, produit d'auto-oxydation de la DA, de la noradrenaline et de la lévodopa (L-dopa) (Wakamatsu et al., 2003). De plus, la NM aurait la capacité de chélater les ions ferriques et d'autres métaux de transition (Zecca et al., 2001). En présence d'un excès d'ions de fer, la NM provoquerait la formation d'espèces radicalaires

toxiques. De plus, la NM synthétique semblerait hausser la toxicité du 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP⁺) (Nguyen et al., 2002). La figure 1.5 illustre bien la perte de la pigmentation neuromélanique.

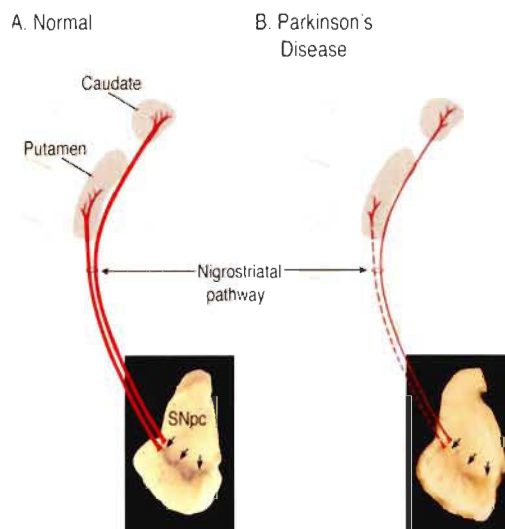


FIGURE 1.5 : Représentation schématique de la voie nigro-striée (rouge) et de la pigmentation de la substance noire. A) Pigmentation normale chez un individu sain et B) Perte de la pigmentation neuromélanique chez un patient parkinsonien (Dauer and Przedborski, 2003).

1.1.5.2 Présence de CL

Certains neurones de la SNc présentent des inclusions cytoplasmiques éosinophiles, des CL qui jouent un rôle important dans la MP, mais aussi dans le cadre de d'autres maladies neurodégénératives. Les CL sont principalement composés de protéines diverses, tels que l' α -synucléine, la parkine, l'ubiquitine et des neurofilaments (Spillantini et al., 1998). Leur localisation s'étendant hors de la zone du mésencéphale corrèle bien avec les symptômes moteurs de la maladie (Natale et al., 2008). Les CL présentent un centre granulaire très dense et ils peuvent être mis en évidence par détection immunohistochimique. La figure 1.6 représente une détection de l' α -synucléine et de l'ubiquitine.

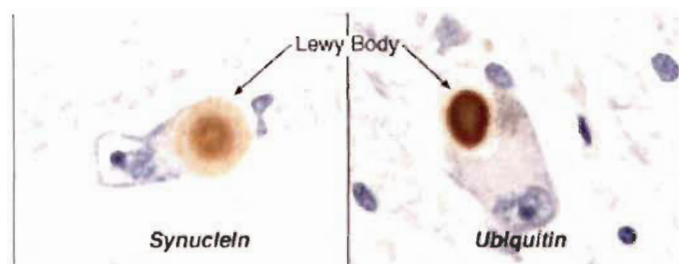


FIGURE 1.6 : Détection immunohistochimique des CL dans les neurones dopaminergiques. Marquage avec un anticorps de l' α -synucléine (à gauche) et de l'ubiquitine (à droite) (Dauer and Przedborski, 2003).

Initialement, dans la MP, les CL typiques étaient considérés comme la cause directe de la dégénérescence neuronale. À présent, ils représentent une caractéristique morphologique typique du processus dégénératif, mais ils détiennent un rôle défensif, c'est-à-dire comme des structures dynamiques qui disposent de puissantes activités enzymatiques (Olanow et al., 2004; Fornai et al., 2005). Récemment, on rapporte une possible interaction en l' α -synucléine et la NM. En effet, cette interaction contribuerait à l'accumulation de l' α -synucléine dans les CL (Double and Halliday, 2006).

1.2 Les causes de la MP

Durant les dernières décennies, les études dérivant d'autopsies ont impliqué un nombre très large de facteurs pouvant causer la mort des neurones dans la MP. Il s'agit du stress oxydant, du dysfonctionnement mitochondrial, de l'apoptose et plus récemment de l'inflammation. Avec les études, il est devenu clair que la situation était plus complexe que les hypothèses initialement établies.

1.2.1 La MP héréditaire

L'étiologie de la MP demeure encore inconnue à ce jour, mais des facteurs génétiques et environnementaux semblent favoriser l'évolution de ce malaise. Dans les faits, il est estimé qu'environ 5-10% des cas de MP sont héréditaires et

causés par des mutations géniques (Dauer and Przedborski, 2003). La MP héréditaire est très similaire à la MP idiopathique. Cependant, il n'en demeure pas moins que la MP héréditaire apparaît généralement plus tôt et présente des signes cliniques atypiques (Vila and Przedborski, 2004). Finalement, certains gènes ont été identifiés par l'étude de familles atteintes par la MP (Pankratz et al., 2002). Les généticiens ont réussi à identifier des mutations importantes de 5 principaux gènes qui pourraient être responsables de la MP (Bertram and Tanzi, 2005). Il s'agit de l' α -synucléine, la parkine, DJ-1, la dardine et PINK1.

Le gène de l' α -synucléine : C'est en 1997 que la mutation d'une alanine pour la thréonine à la position 53 sur le gène *PARK1* a été identifiée (Polymeropoulos et al., 1997). Cette mutation cause la forme héréditaire de la MP et elle se retrouve dans le gène de la protéine α -synucléine. Il existe deux autres mutations sur le gène de l' α -synucléine. Malgré que la fonction de la protéine α -synucléine demeure toujours à élucider, on connaît sa localisation. En fait, elle se retrouve principalement dans les terminaisons synaptiques et dans le cytosol des cellules (Goedert, 2001). L' α -synucléine est un composant abondant dans les CL, sous sa forme fibrillaire en feuillet bêta, lesquels sont retrouvés dans le soma des neurones dopaminergiques de patients parkinsoniens (Spillantini et al., 1997). Donc, l'agrégation des formes fibrillaires de l' α -synucléine conduit à l'effet pathogène de cette protéine. Il existe de nombreuses évidences *in vitro* et *in vivo* entre l' α -synucléine et le stress oxydant (Tabrizi et al., 2000; Orth and Tabrizi, 2003). Maintenant, il serait important de préciser les conséquences directes de la mutation en position 53 du gène de l' α -synucléine. Plus précisément, la mutation en position 53 diminue la possibilité d'association entre les plans lipidiques des membranes par sa conformation en feuillet bêta (figure 1.7).

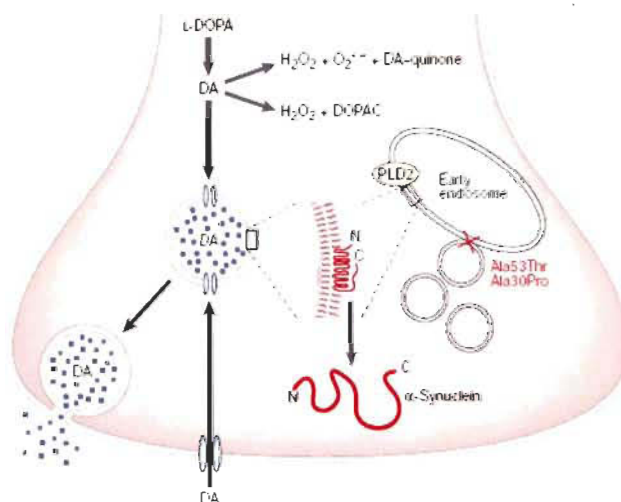


FIGURE 1.7 : Le rôle de l' α -synucléine et du stockage de la DA (Lotharius and Brundin, 2002).

Une importante fonction neuronale de l' α -synucléine est de réguler la formation de liens entre les vésicules synaptiques et les endosomes par le biais de la phospholipase D2 (PLD 2). Une mutation dans l' α -synucléine résulte en un nombre réduit de vésicules disponibles pour le stockage de la DA, menant ainsi à une accumulation de DA dans le cytoplasme de la cellule et à un niveau élevé de stress oxydant (figure 1.7) (Lotharius and Brundin, 2002). Récemment, il a aussi été démontré que l' α -synucléine peut activer la microglie. De faibles concentrations en α -synucléine diminuent la toxicité induite par la DA dans un système de microglie. De plus, l' α -synucléine active la microglie à générer des ions superoxide, à augmenter le niveau intracellulaire d'espèces oxygénées réactives (ROS) pour ensuite induire des changements morphologiques des cellules microgliales. Ces dernières sont activées et phagocytent l' α -synucléine (Zhang et al., 2005).

Le gène de la parkine : En général, les mutations dans le gène de la parkine sont retrouvées chez des patients atteints de la MP avant l'âge de 30 ans (Mizuno et al., 2001). Une perte de fonction dans le gène codant pour la parkine cause la forme juvénile du parkinson (Lincoln et al., 2003). La parkine est une

protéine de 465 acides aminés formée de plusieurs domaines, tels que le domaine N-terminal qui a une grande homologie avec l'ubiquitine. En effet, la parkine est une E3 ubiquitine ligase, fondement du système ubiquitine-protéasome (Shimura et al., 2000). Donc, elle permet principalement l'ubiquitination des protéines défectueuses et leur dégradation par le protéasome. Un dysfonctionnement de cette protéine mène à l'accumulation de protéines défectueuses, ce qui pourrait être responsable de la mort des neurones dopaminergiques de la SNc ou de la sensibilité au stress (Kitada et al., 1998).

Le gène DJ1 : Le gène DJ-1 code pour une protéine ubiquitaire et largement conservée, mais dont on ne connaît pas encore bien la fonction. DJ1 est fortement exprimé dans le cerveau et dans les tissus périphériques. DJ1 est associé à la MP, car il serait impliqué dans la réponse au stress oxydant et la maintenance de l'équilibre mitochondrial. Il y a plus de 11 mutations autosomales-récessives associées à ce gène et elles ont été identifiées dans deux familles de consanguinité Européennes (Abou-Sleiman et al., 2003; Bonifati et al., 2003). Cette protéine possède divers rôles, mais tout particulièrement celui de protéine antioxydante en réponse au stress oxydant. En effet, l'étude de Canet-Aviles démontre que des cellules traitées avec un oxydant, tel que l'herbicide paraquat ou le peroxyde d'hydrogène, favorise le changement du pH d'ionisation de la protéine DJ1 (par la modification des résidus cystéines). Les cellules sont ainsi protégées contre le stress induisant leur mort (Canet-Aviles et al., 2004).

Le gène de la dardine : Le gène de la protéine dardine est le LRRK 2, ce qui signifie une kinase 2 avec des répétitions riches en leucine. Une mutation dans LRRK2 survient dans environ 5 à 6% des cas de MP idiopathique (Gilks et al., 2005). On sait qu'elle est généralement associée à la membrane externe de la mitochondrie, elle est capable d'auto-phosphorylation et elle peut lier la protéine parkine (Smith et al., 2005). Même si les conséquences de la mutation de ce

gène ne sont pas encore vraiment connues, on constate qu'il y a une modification dans l'activité protéine kinase de la protéine. Ainsi, l'altération de cette kinase pourrait entraîner la phosphorylation de l' α -synucléine et de tau, protéines importantes impliquées dans la MP (Zimprich et al., 2004).

Le gène PINK1 : PINK1 code pour une protéine kinase activée par PTEN (Abou-Sleiman et al., 2006). Cette enzyme se retrouve dans la mitochondrie et semble prévenir une dysfonction de la mitochondrie en cas de stress oxydant. Ce gène a été identifié chez 3 grandes familles co-sanguines, dont une espagnole et deux italiennes. PINK1 est une protéine de 581 acides aminés formée d'un domaine N-terminal de positionnement mitochondrial, un motif de répétition sérine/thréonine hautement conservé et un domaine C-terminal d'auto-régulation. Plusieurs études dévoilent que la fréquence des mutations dans PINK1 se situe entre celles retrouvées chez DJ1 et chez la parkine (Rogaeva et al., 2004; Bonifati et al., 2005). La mutation affectant PINK1 se retrouve entre les acides aminés 30 à 150; mutation complètement externe du domaine fonctionnel de l'enzyme. L'enzyme possède une activité kinase et une mutation pourrait modifier sa réponse au stress.

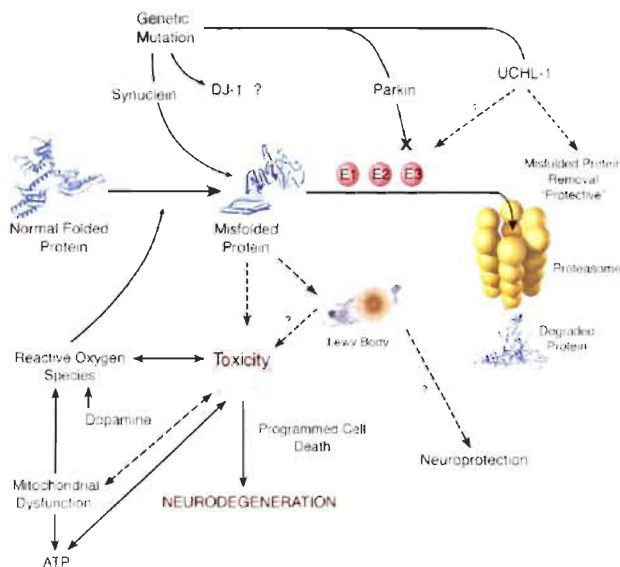


FIGURE 1.8 : Résumé des différents gènes mutés dans la MP (Dauer and Przedborski, 2003).

La figure 1.8 fait un sommaire des gènes pouvant être mutés et les conséquences de ces mutations.

1.2.2 La MP idiopathique

La MP idiopathique est présente dans 95% des nouveaux cas diagnostiqués. Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer l'apparition sporadique d'une telle maladie. Les progrès le plus intéressants ont été faits durant les dernières années, mais aucune hypothèse n'émerge significativement. Bien sûr le vieillissement est un facteur de risque majeur, mais les facteurs environnementaux ne sont pas sans importance. En fait, l'exposition à des toxines telles que les pesticides et les insecticides et la pollution pourraient générer un environnement radicalaire et induire un stress oxydant sur les neurones du cerveau. Les prochains paragraphes discuteront de ces dires.

1.2.2.1 Le stress oxydant

L'oxygène est essentiel à la vie humaine, sans lui, nous ne pouvons pas survivre. Toutefois l'oxygène est également impliqué dans des réactions toxiques et constitue, par conséquent, une menace pour le bien-être de toute vie. En effet, le stress oxydant joue un rôle important dans la mort des neurones dopaminergiques de la SN et dans plusieurs autres maladies neurodégénératives (Gutteridge, 1993; Fukui and Moraes, 2008). Cet état de stress résulte d'une surproduction de ROS ou radicaux libres (RL), telles qu' $O_2^{\bullet-}$ et $\bullet OH$, et d'une diminution des défenses antioxydantes de l'organisme. Donc, le faible impact des défenses antioxydantes face à la surpopulation d'espèces extrêmement réactives provoque une mauvaise inhibition des RL (figure 1.9).

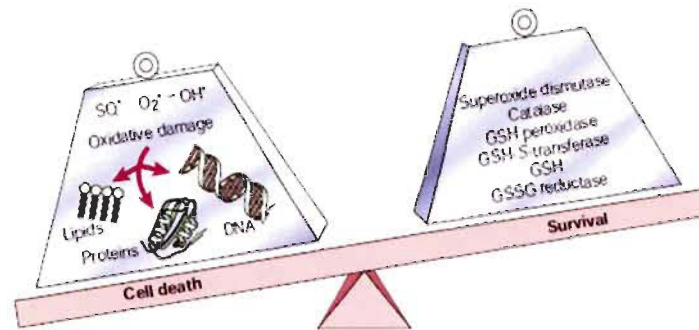


FIGURE 1.9 : Représentation schématique du déséquilibre entre les ROS causant le stress oxydant et les défenses antioxydantes du corps (Lotharius and Brundin, 2002).

Les RL sont des espèces extrêmement réactives et toxiques pour l'organisme. L'absence d'électrons appariés rend ces molécules très instables et ils tentent à remédier à cette situation en réagissant avec des composants cellulaires (ADN, ARN et protéines). Les RL proviennent de deux sources, c'est-à-dire qu'ils peuvent être produits de façon naturelle par le corps (et ils sont essentiels au bon fonctionnement du métabolisme) ou bien suite à un apport externe trop important (ce qui crée un déséquilibre interne). De plus, chez les parkinsoniens, certaines enzymes antioxydantes présentent une réduction de leurs activités, ce qui contribue à la présence d'espèces réactives. Il s'agit de la catalase (Cat) et de la glutathione peroxydase (GPx) (Schulz et al., 2000). D'autres études dévoilent que l'activité de la SOD semble augmenter dans les tissus nigraux des patients parkinsoniens (Marttila et al., 1988; Saggiu et al., 1989). D'autre part, on retrouve de fortes concentrations en fer dans la substance noire d'un patient parkinsonien. La présence de ce fer peut catalyser les réactions d'oxydation (Riederer et al., 1989). Ces prochains points seront expliqués dans les paragraphes qui suivent.

Dans le cadre de la MP, **les RL endogènes** sont la résultante de différents mécanismes. Tout d'abord, le métabolisme de la DA mène à la formation de molécules sévèrement toxiques par les différentes réactions présentées à la figure 1.10.

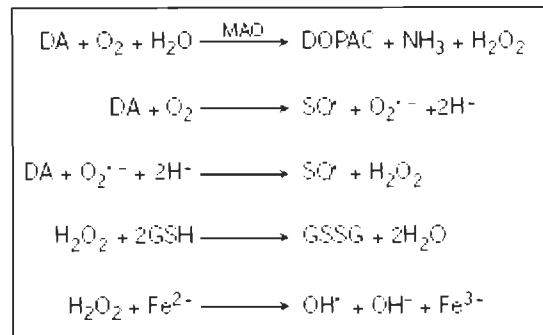


FIGURE 1.10 : Différents métabolismes de la DA menant à la formation d'espèces toxiques à la cellule (Lotharius and Brundin, 2002).

Comme présenté par la deuxième et la troisième réaction de la figure précédente, la DA peut s'auto-oxyder, à des pH normaux, en dopamine-quinone, en $\text{O}_2^{\bullet -}$ et en peroxyde d'hydrogène (Graham, 1978). Aussi, un des produits de dégradation de la DA est la NM pigment de couleur brunâtre qui a permis la découverte de la DA comme source majeure de RL (figure 1.11).

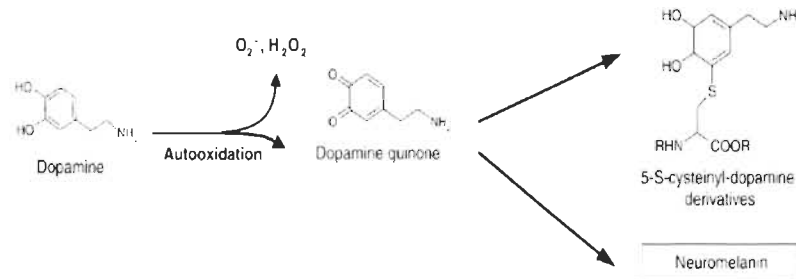
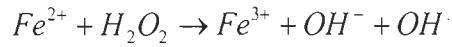


FIGURE 1.11 : Réaction d'auto-oxydation de la DA.

Parallèlement, la DA peut être enzymatiquement (par la monoamine oxydase (MAO)) convertie en produit non-toxique l'acide 3,4-dihydrophénylacétique (DOPAC) et en peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde n'est pas très réactif, mais il peut se convertir en RL très toxique par une réaction chimique catalysée par le fer (réaction de Fenton) et forte présence dans la substance noire. Les RL provoquent l'altération des protéines, de l'ADN et des lipides.



Réaction de Fenton

[1.1]

Par conséquent, les fortes concentrations de fer dans la substance noire deviennent une évidence du stress oxydant.

Je mentionne aussi qu'on retrouve des espèces azotées réactives (RNS) qui peuvent être générées par des processus biologiques. En effet, de l'oxyde nitrique (NO) peut être formée par l'oxyde nitrite synthétase (NOS). L'inhibition de certains isoformes de NOS contribue à la résistance au 1-méthyl-4-phényl-1,2,5,6-tétrahydropyridine (MPTP) et stipule que le NO est requis pour l'induction de la mort par le MPTP. Par exemple, on peut inhiber la forme NOS1 chez le babouin et la forme NOS2 chez la souris (Hantraye et al., 1996; Wu et al., 2002). Le NO peut réagir avec O_2^- pour produire du peroxynitrite ($ONOO^-$) (figure 1.12).

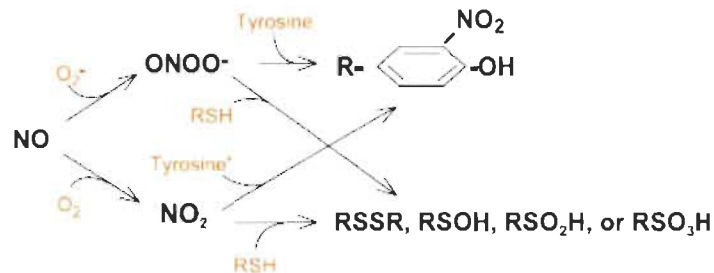


FIGURE 1.12 : Biochimie du NO menant à la formation de l'ion $ONOO^-$ (Brown and Borutaite, 2004).

L' $ONOO^-$ peut oxyder ou nitrer d'autres molécules, ce qui produit des espèces dommageables. L'inhibition du complexe I peut être produite par l' $ONOO^-$. Finalement, l' $ONOO^-$ est un oxydant fort et il peut induire la peroxydation lipidique et augmenter la perméabilité mitochondriale (Gadelha et al., 1997).

Pour leur part, les **RL exogènes**, externes à l'organisme, peuvent être produits suite à une exposition à un environnement toxique, tels que les pesticides et les insecticides.

Les cibles du stress oxydant : Le stress oxydant a pour cible les protéines, les lipides et l'ADN. L'oxydation basale des protéines est relativement élevée dans la SNc et dans le cadre de la MP, la quantité de groupements carbonyles réactifs est aussi augmentée (Dexter et al., 1989; Jenner, 1991). D'autre part, on remarque que les carbonyles protéiques augmentent dans les autres régions du cerveau (Alam et al., 1997a). De plus, la peroxydation lipidique est largement plus importante dans la MP. En effet, on retrouve une diminution des acides gras polyinsaturés (substrats de la peroxydation lipidique) et une augmentation du niveau de malondialdéhyde (MDA) et de 4-hydroxynonéal (HNE) (Dexter et al., 1989; Yoritaka et al., 1996). Le MDA peut se conjuguer avec des résidus lysines de diverses protéines (MDA-Lys). L'isolation post-mortem, chez des patients parkinsoniens, de l' α -synucléine provenant du cortex frontal présente cette modification protéique (Dalfo and Ferrer, 2008). Le HNE, composé lipophile fortement réactif, mène à la formation de produits avec des groupements nucléophiles stables, tels que des groupements thiols et amines. Le HNE conduit à l'activation des différentes caspases et à la fragmentation de l'ADN (Raza et al., 2008). Il inhibe la voie de signalisation de NF- κ B, ce qui inclut le clivage de la poly (ADN-ribose) polymérase (PARP) et une diminution de la GPx (Ji et al., 2001). En somme, les dommages lipidiques conduisent à la perte d'intégrité des membranes et au phénomène d'exotoxicité (Halliwell, 1992).

Le prochain marqueur du stress oxydant semble être la présence de produits d'oxydation de la base azotée guanine. Il s'agit d'un changement de potentiel d'oxydo-réduction de la guanine qui devient relativement élevé dans les neurones affectés chez un patient parkinsonien comparativement aux neurones des autres régions du cerveau (Zhang et al., 1999). Dans les faits, l'attaque des bases azotés guanines survient plus particulièrement par les \bullet OH. Cette attaque

chimique provoque la formation de deux produits : le 8-hydroxyguanine et le 8-hydroxy-2-déoxyguanosine.

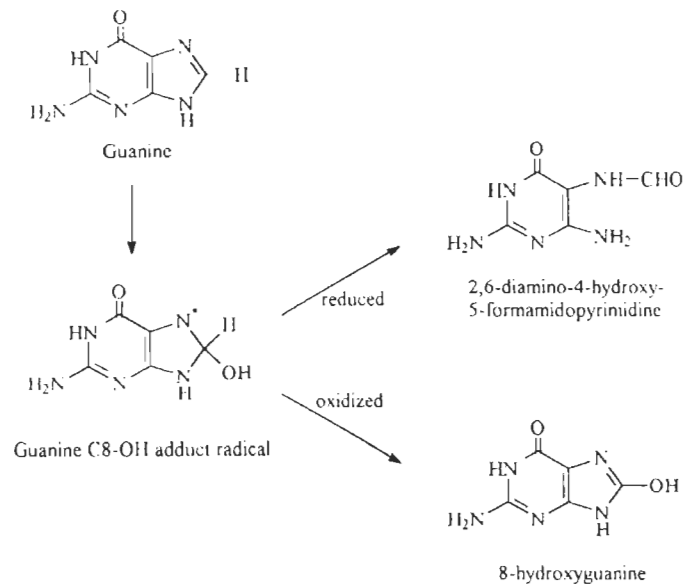


FIGURE 1.13 : Mécanisme de formation des produits d'oxydation de la base azotée guanine (Alam et al., 1997b).

Sommairement, lors de l'attaque des radicaux libres sur la guanine, il se forme un intermédiaire instable d'où peuvent dériver des produits d'oxydation, un produit réduit (Fapy) et l'autre oxydé (8-hydroxyguanine). Dans la MP, on retrouve une plus grande présence de 8-hydroxyguanine et une diminution de la forme Fapy (Alam et al., 1997b).

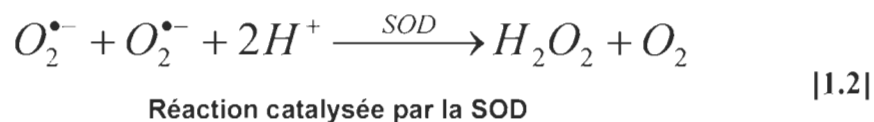
1.2.2.2 Les défenses antioxydantes de l'organisme

Les défenses enzymatiques

Tout au cours de sa vie, l'homme est confronté à l'action néfaste des RL. Par conséquent, l'évolution de l'homme a assuré le maintien de l'homéostasie cellulaire par la création de défenses naturelles : les enzymes. Cette évolution est une barrière naturelle contre l'effet du vieillissement. Le corps contient plusieurs enzymes, mais il sera question essentiellement de celles qui ont une répercussion directe contre les RL. Il s'agit de la SOD, de la Cat et de la GPx.

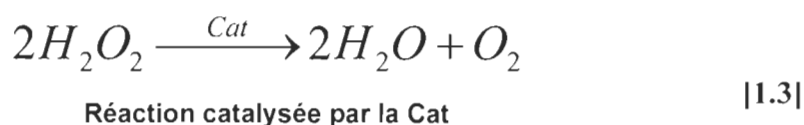
L'implication de ces enzymes dans la MP sera discutée dans la section « Les altérations de la MP qui favorisent le stress oxydant à la section 1.2.2.3».

La SOD (EC 1.15.1.1) possède une activité antioxydante très effective. Elle catalyse la transformation de l'espèce $O_2^{\bullet-}$ (très réactive) en des produits de réaction beaucoup moins néfastes. Il s'agit de peroxyde d'hydrogène et d' O_2 . La réaction suivante illustre la réaction catalysée par la SOD.



Plus précisément, on retrouve la SOD sous deux isoformes, qui diffèrent par la nature du métal actif dans le centre réactionnel et par la séquence en acides aminés. Il existe la forme cytosolique (Cu-Zn SOD), la forme mitochondriale (Mn SOD) et la SOD extracellulaire (EC-SOD) (Landis and Tower, 2005).

La Cat (EC 1.11.1.6.) se retrouve principalement dans les peroxysomes et elle possède un métabolisme très élevé. En fait, une molécule de Cat convertit tout près de six millions de molécules de peroxyde d'hydrogène. Elle est une enzyme catalysant la décomposition de l'eau oxygénée en eau et en O_2 par la réaction chimique suivante.



La GPx (EC 1.11.1.9) se retrouve essentiellement sous deux formes, une qui est sélénium-dépendante et l'autre qui est sélénium-indépendante (Mates et al., 1999). Cette enzyme décompose les peroxydes organiques, avec l'aide de la glutathion, en eau.



Les défenses non-enzymatiques

La vitamine C, la vitamine E et la glutathione totale (GSH) sont les principaux antioxydants non-enzymatiques favorisant un environnement sans RL. L'acide ascorbique, ou vitamine C, demeure un antioxydant puissant qui existe sous plusieurs formes. La forme AscH^- réagit avec les RL et se transforme sous une forme radicalaire très peu réactive, puisque son électron impair se trouve dans le cycle phénolique et est énergétiquement stable. La figure 1.14 présente l'acide ascorbique sous sa forme radicalaire.

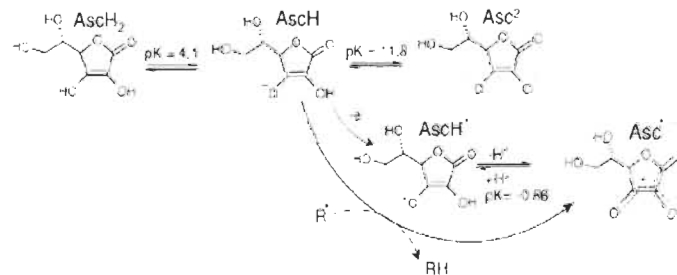


FIGURE 1.14 : Formes variées de la vitamine C et sa réaction avec le RL (Valko et al., 2006).

La vitamine E se retrouve sous huit formes différentes. Chez l'homme, l' α -tocophérol demeure la forme la plus active. L' α -tocophérol réagit avec les RL et se convertit sous une forme radicalaire peu réactive. Comme le démontre la réaction 8 de la figure 1.15, la vitamine E peut être régénérée par la vitamine C.

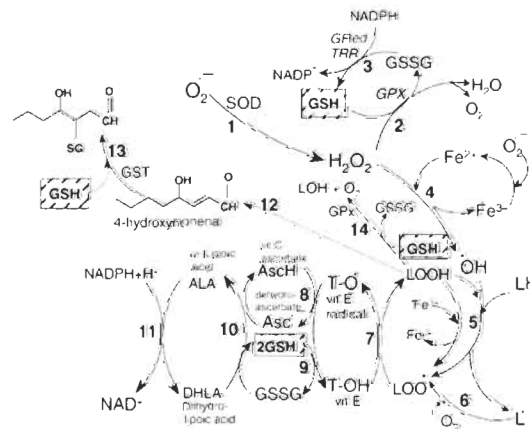


FIGURE 1.15 : Voie de signalisation de différents antioxydants : la vitamine C, E et la GSH (Valko et al., 2006).

Pour sa part, la GSH est un tripeptide intracellulaire multifonctionnel. Lorsque la GSH est oxydée (GS[•]) (lorsqu'elle a transféré un proton aux vitamines) elle peut réagir avec une autre molécule de GSH oxydée et former la molécule GS-SG. Par la suite, elle peut être réduite en GSH à nouveau par la glutathion réductase NADPH-dépendante. Aussi, la vitamine C radicalaire peut être reconvertie en vitamine C intacte par la GSH (Valko et al., 2006).

1.2.2.3 Les altérations de la MP qui favorisent le stress oxydant

Altération du contenu en fer

Normalement, les ions ferriques et plusieurs autres sont essentiels au bon fonctionnement de l'organisme. Par exemple, le fer demeure important dans la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines. Il agit aussi en tant que cofacteur pour certaines enzymes, telles que celles impliquées dans la respiration cellulaire. Dans la MP, il y a plusieurs altérations qui favorisent l'apparition du stress oxydant dont celle du contenu en fer. En effet, l'équipe du chercheur Reiderer a trouvé qu'il n'y avait pas de différence significative chez des patients en début de maladie tandis que les analyses des patients en stade avancé de la maladie démontrent une augmentation significative du contenu en fer (Riederer et al., 1989). De façon plus précise, par des analyses immuno-histochimiques l'équipe de Faucheux rapporte que l'augmentation survient dans la SNc, car le fer s'accumule dans les granules neuromélaniques.

Maintenant, comment peut-on expliquer la hausse du fer dans la SNc? Selon un article de 2004 de l'auteur Zecca, la hausse du fer est une conséquence de la mort neuronale et la substitution des ces neurones par des cellules à forte concentration en fer. De plus, la hausse de fer pourrait s'expliquer par une défaillance de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui permet un plus grand passage de fer au niveau du cerveau (Zecca et al., 2004). Finalement, un polymorphisme dans le gène de la transferrine serait aussi responsable de

l'augmentation du fer dans le cerveau (Borie et al., 2002). Quelques équipes ont tenté de reproduire l'augmentation en fer dans la SNc en injectant directement du fer dans la région nigrale du cerveau de souris. En plus d'avoir généré un bon modèle de stress oxydant, ces chercheurs ont obtenu des données histologiques, biochimiques et comportementales associées au parkinsonisme (Sengstock et al., 1994).

Altération des fonctions mitochondriales

Plusieurs recherches supportent l'hypothèse que la dysfonction mitochondriale est en partie responsable de l'étiologie de la MP. L'autopsie d'un patient atteint de la MP montre une diminution de l'activité de la chaîne de transport d'électrons du complexe I (Shults et al., 1997). Une étude faite sur une lignée cellulaire hybride contenant un génome nucléaire normal mais ayant un génome mitochondrial MP démontre une instabilité du complexe I, une morphologie mitochondriale anormale et une forte baisse des activités énergétiquement dépendantes de la mitochondrie (Trimmer et al., 2000).

De plus, une autre évidence démontre la susceptibilité des neurones dopaminergiques au stress oxydant. Des expériences sont faites avec des souris déficientes versus des souris contrôles pour comparer leur susceptibilité au MPTP, toxine utilisée fréquemment pour causer la MP dans les modèles animaux. Quand les souris sont déficientes pour une protéine de couplage (UCP-2) de la chaîne respiratoire, l'étude démontre bien une réduction du couplage mitochondrial dans la SN, une production plus importante de ROS et une diminution du nombre de mitochondries par neurones (Andrews et al., 2005). Les mitochondries sont considérées comme médiateurs de la mort neuronale dans plusieurs troubles dégénératifs. L'implication des mitochondries dans la mort neuronale n'est pas limitée au simple déficit de production d'ATP dû au découplage des complexes de la chaîne respiratoire, mais aussi à l'activation des voies apoptotiques de la cellule.

L'altération des défenses antioxydantes

Précédemment, nous avons expliqué l'implication de la SOD, de la Cat et de la GPx dans la détoxification de la cellule des RL. Maintenant, il sera question de la modulation de ces enzymes dans les études pour la MP, puisque des études *in vivo* ont été faites avec chacune des enzymes. Chez des patients atteints de la MP, on remarque une hausse de l'activité de la Cu/Zn SOD (Marttila et al., 1988; Bowling and Beal, 1995). Certaines études démontrent une augmentation de la Cu/Zn SOD suite à un traitement au MPTP (Thomas and Mohanakumar, 2004) et chez des cellules PC12 neuronales en culture (Lahaie-Collins et al., 2008). Il s'agirait une réponse compensatoire au stress oxydant (Marttila et al., 1988).

D'autre part, une étude *in vitro* chez des cellules PC12 présente une diminution de la Cat et de la GPx suite à l'influence de différentes toxines (MPP+ et peroxyde d'hydrogène) (Tsai and Yin, 2008). De plus, ces recherches sont conformes à la baisse en Cat dans la SNc des patients parkinsoniens. Des études immuno-histochimiques ont aussi été faites pour évaluer la distribution de l'ARN messager (ARNm) de la GPx suite à des traitements au MPTP chez des singes ainsi que chez des patients parkinsoniens versus normaux. Ainsi, il est démontré une diminution de la GPx dans la SNc chez le singe suite aux traitements au MPTP. Chez le patient parkinsonien, la GPx est presque totalement absente dans la SNc (Kunikowska and Jenner, 2003).

Altération du contenu en GSH

La GSH est une défense antioxydante essentielle dans la protection du cerveau contre les dommages du stress oxydant induit par les ROS. En effet, un haut taux de GSH protège contre les attaques des ROS, et ce, de façon non-enzymatique. D'autre part, par son action enzymatique, la GSH réagit avec les peroxydes pour les convertir en eau et devient sous sa forme oxydée (Yu, 1994; Davies, 2000). Suite aux autopsies de cerveaux de patients parkinsoniens,

l'étude de Perry et son collègue permet d'établir une déficience en GSH dans la SNc versus les autres régions du cerveau (Perry and Yong, 1986).

Changement du métabolisme «turnover» de la DA

La DA est un neurotransmetteur stable dans les vésicules synaptiques. Bien que plusieurs régions du cerveau contiennent de la DA, la plus importante de ces régions demeure le striatum, dont les afférences principales proviennent de la SNc. En temps normal, les surplus de DA excrétés de la vésicule dans la fente synaptique sont métabolisés en peroxyde d'hydrogène par la monoamine oxydase (MAO) et la GPx transforme le tout en eau. Dans la MP, il est reporté que la GPx est diminuée et que la concentration en fer de la SNc est augmentée. Par conséquent, le métabolisme de la DA change complètement et il survient une forte production de RL menant au stress oxydant (Jenner et al., 1992; LaVoie and Hastings, 1999).

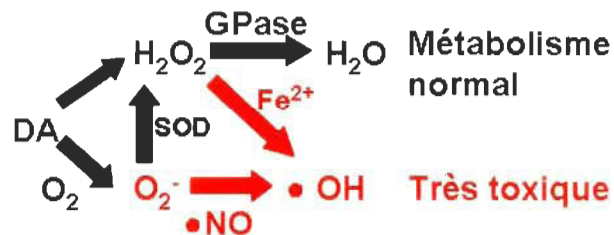


FIGURE 1.16 : Métabolisme normal de la DA (noir) ainsi que le métabolisme altéré lors de la MP (rouge).

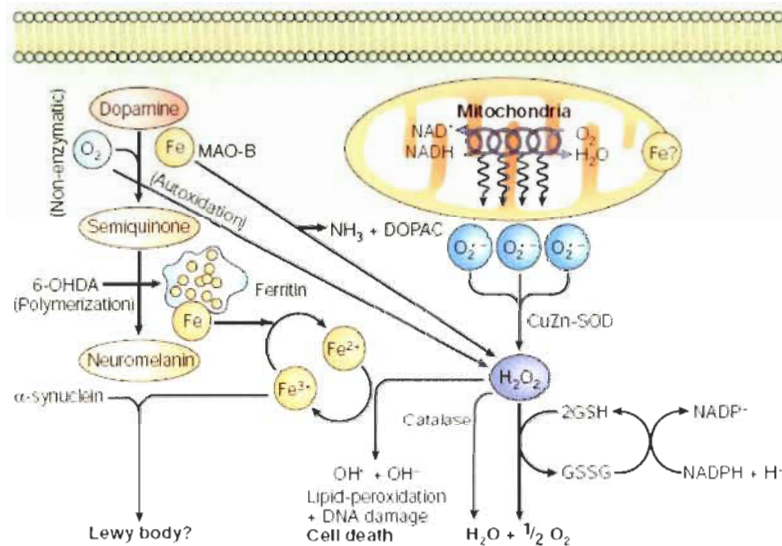


FIGURE 1.17 : Résumé des sources de radicaux libres et des défenses antioxydantes de la cellule (Zecca et al., 2004).

1.2.2.4 La résultante du stress oxydant : l'apoptose

Les dommages résultant du stress oxydant conduisent à la mort des neurones dopaminergiques. Plus précisément, ils meurent en suivant la voie de l'apoptose (Hirsch et al., 1999). L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmé enclenché lorsque la cellule a perdu son intégrité de structure et de fonction. L'apoptose se caractérise par des changements morphologiques typiques : le rétrécissement de la cellule, la condensation et la dégradation de l'ADN. La fragmentation de l'ADN survient. Les corps apoptotiques résultant seront rapidement phagocytés par les macrophages, éliminant ainsi tout risque d'inflammation. La mort par apoptose transige essentiellement par la mitochondrie et suite à un stimulus apoptotique, le potentiel membranaire mitochondrial est modifié. La mitochondrie devient perméable à divers ions (Ferri and Kroemer, 2001). Aussi, la formation et l'ouverture du pore de transition libère le cytochrome c (CytC) dans le cytosol des neurones, enclenchant l'activation d'une cascade de protéases régulant la mort cellulaire, les caspases. Ces enzymes inhibent la réparation de l'ADN et activent le processus de fragmentation de l'ADN (figure 1.20).

Plusieurs protéines possèdent une participation active dans les mécanismes de mort apoptotique. De son côté, Bcl-2 est une protéine anti-apoptotique principalement localisée dans la membrane externe de la mitochondrie, mais elle a quelques liaisons avec la membrane interne (Reed et al., 1998). Les propriétés anti-apoptotiques de cette protéine lui sont conférées grâce à sa capacité à prévenir le relâchement du CytC (Kluck et al., 1997). De plus, la mitochondrie relargue plusieurs éléments pro-apoptotiques, comme le facteur inducteur d'apoptose (AIF), ainsi que le découplage de protéine de surface, comme Bax, qui s'active à son tour pour engendrer la cascade apoptotique (Vekrellis et al., 1997).

La voie de relâche du CytC (figure 1.18) par le pore membranaire implique l'activation de la protéine Bax. Cette voie d'activation de l'apoptose est intéressante pour la MP, car des études montrent que des souris déficientes en Bax sont résistantes au MPP⁺ (Vila et al., 2001). L'activation de ce pore est reconnue pour être accomplie en présence d'agents toxiques, alors qu'en présence d'agents neuroprotecteurs l'ouverture de ce pore semble être inhibée (Korsmeyer et al., 2000; Polster et al., 2001; Kuwana et al., 2002).

La voie de relâchement d'AIF (figure 1.19) est complètement différente de celle du CytC. En effet, en conditions physiologiques, AIF est lié à la membrane interne de la mitochondrie. Suite à un stimulus apoptotique et une suractivation de PARP-1, AIF se détache de la membrane interne de la mitochondrie pour se relocaliser dans le cytoplasme, puis dans le noyau. La relâche d'AIF est complètement indépendante de l'activation des caspases. Finalement, la redistribution d'AIF induit le clivage de l'ADN chromosomique (Smith et al., 2008). Plus précisément, la translocation de la mitochondrie vers le noyau mène à une fragmentation de l'ADN de grande ampleur (Krantic et al., 2007). Une étude *in vivo* chez un modèle de rongeurs traité au MPP⁺ indique la participation active d'AIF dans la mort cellulaire programmée des neurones (Liou et al.,

2005). Le temps entre la redistribution d'AIF et la relâche du CytC dépend du type de stimulus et des lignées cellulaires utilisées (Smith et al., 2008).

La neuroprotection dans la MP passe aussi par des stratégies d'étude de la protéine Bcl-2. En effet, Bcl-2 et son homologue Bcl-XL exercent une forme d'activité antioxydante cytoprotectrice contre les ROS et qui peut aussi inhiber la perméabilité mitochondriale (Kowaltowski et al., 2000; Ouyang et al., 2002). De plus, Bcl-2 peut inhiber directement Bax, par une interaction protéine-protéine, inhibant de ce fait la formation du pore de transition (Cheng et al., 2001). La stimulation de l'expression de Bcl-2 a été démontrée dans plusieurs cas d'ischémie (Alkayed et al., 2001).

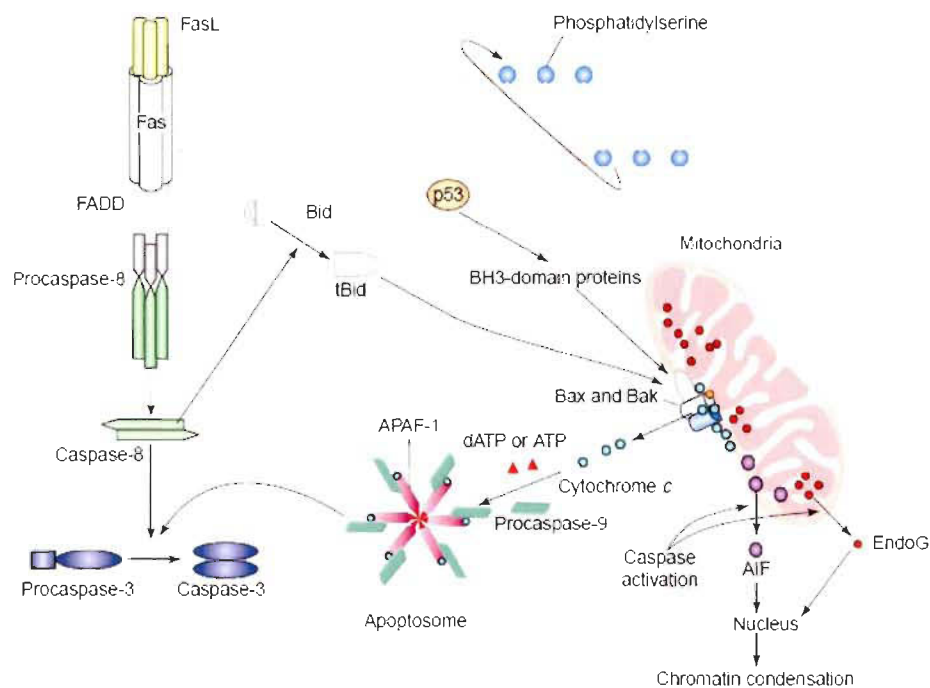


FIGURE 1.18 : Schéma des voies intracellulaires de la mort cellulaire programmée (Krantic et al., 2007).

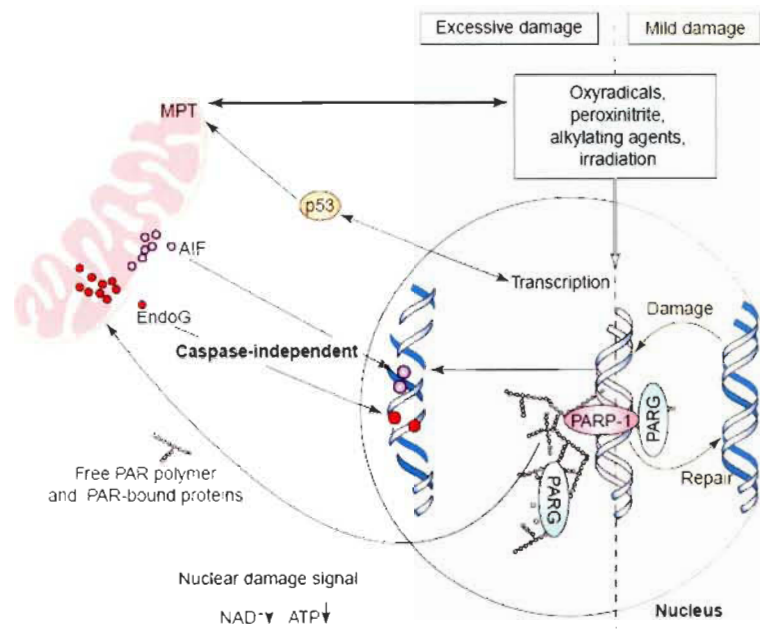


FIGURE 1.19 : Mise en évidence de la relâche d'AIF de la mitochondrie vers le noyau suite à la perturbation du potentiel mitochondrial (Krantic et al., 2007).

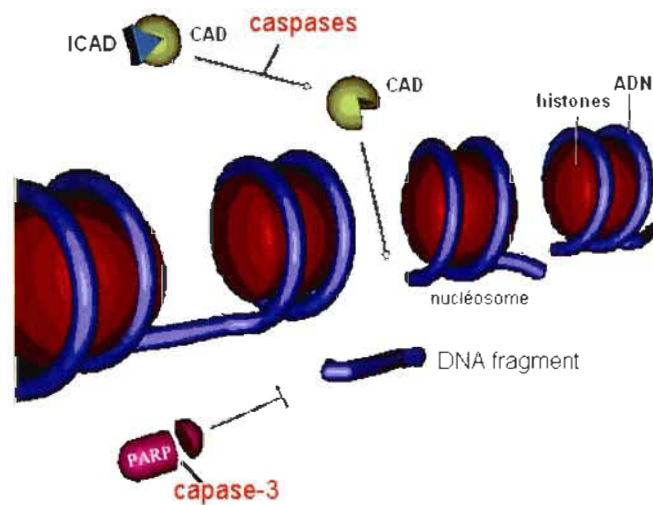


FIGURE 1.20 : Étape finale de l'apoptose : la fragmentation de l'ADN.

1.2.2.5 Le stress oxydant reproduit expérimentalement par le MPTP et son métabolite actif (MPP⁺)

Le meilleur modèle pour la MP neurodégénérative est la toxicité induite par le MPTP. En 1982, suite à une intoxication à l'héroïne synthétique, des sujets ont développé des symptômes cliniques, biochimiques et neuropathologiques similaires à ceux de la MP idiopathique (Langston and Ballard, 1983). Le contaminant responsable de cet état pathologique des patients était le MPTP. Cette découverte a permis d'obtenir un modèle de primate, de souris et cellulaire des plus efficaces pour caractériser la MP. Le modèle MPTP est sans doute celui le plus utilisé jusqu'à maintenant (Przedborski et al., 2001). Plusieurs mécanismes de toxicité du MPTP semblent impliqués, notamment l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Nakai et al., 2003), la production de ROS, d'inflammation, d'activation de récepteurs excitateurs et d'apoptose (Dawson, 2000; Beal, 2001). Ce modèle possède un avantage compétitif sur les autres modèles : (1) le MPTP cause une intoxication spécifique des neurones dopaminergiques et (2) il induit des symptômes identiques à la MP chez les souris et les singes (Przedborski and Vila, 2003). Le MPTP est hautement lipophile. Après une administration systémique, il passe la BHE (figure 1.21) et est capturé principalement par les astrocytes. Par la suite, il est métabolisé en protoxine (1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridium (MPDP)) par la MAO-B, puis s'oxyde rapidement en MPP⁺ (Przedborski and Vila, 2003). Une fois libéré dans le liquide céphalorachidien, sa recapture par des cellules neuronales se fait spécifiquement via le transporteur de la dopamine (DAT) (Bezard et al., 1999).

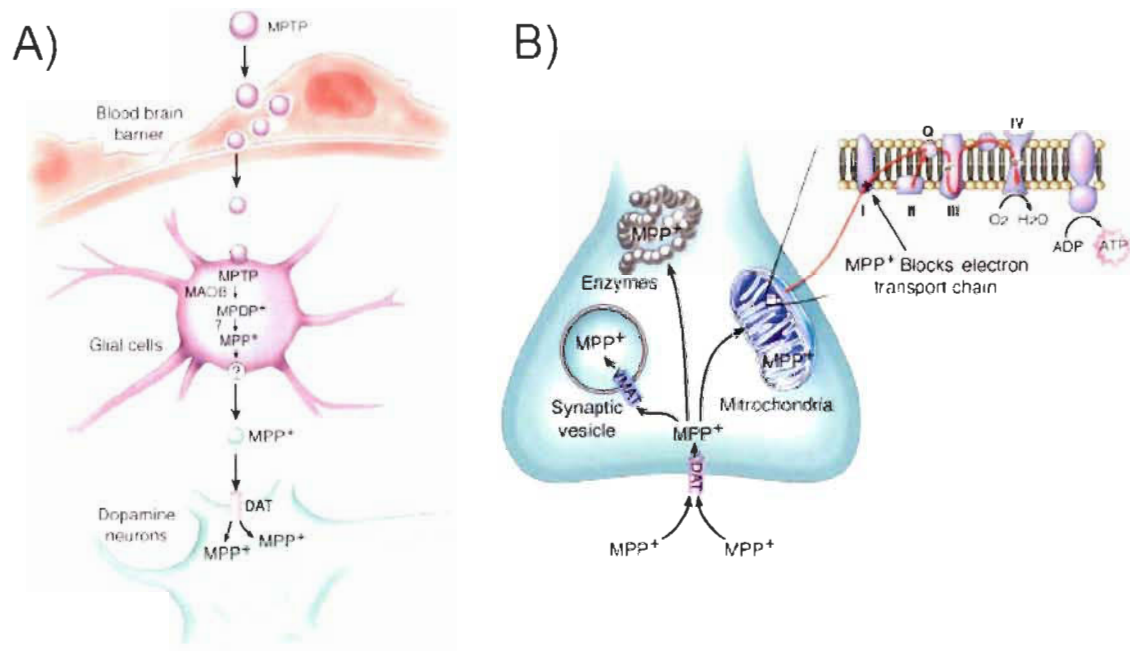


FIGURE 1.21 : A) Représentation schématique du métabolisme du MPTP et B) Mécanismes d'action intracellulaire du MPP⁺ (Dauer and Przedborski, 2003).

1.2.2.6 L'inflammation et la MP

L'inflammation est mise en branle par le système immunitaire en réponse à une infection ou une irritation. Elle se caractérise par un mouvement de leucocytes des vaisseaux sanguins vers le site de l'infection, et ce par l'augmentation de la perméabilité des capillaires et l'expression de diverses molécules d'adhésion et chémo-attractives. Normalement, l'inflammation aide le système immunitaire à contrecarrer les stades de l'infection, mais elle peut aussi conduire à un dommage progressif des tissus. Ce type d'événement survient dans le cadre de la MP (Whitton, 2007). En effet, au cours du processus de neuroinflammation, diverses cytokines et radicaux libres sont produits et peuvent causer la mort neuronale par apoptose.

La microglie est le type cellulaire principalement impliqué dans le processus d'inflammation. Il s'agit de cellules phagocytaires participant au contrôle immuno-physiologique du système nerveux central (Aquilano et al., 2008). La

microglie s'active en présence de différentes molécules, tel le lipopolysaccharide (LPS) et par diverses toxines servant de modèles expérimentaux à la MP. Plus particulièrement, il s'agit de la roténone contenue dans les pesticides et les herbicides (Gao et al., 2002), de la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (He et al., 2001) et du MPTP (Gao et al., 2003).

L'activation de la microglie est aussi associée à une augmentation de l'expression de deux enzymes importantes dans l'inflammation : la synthèse d'oxyde nitrique inducible (iNOS) et la cyclooxygénase (COX-2), responsables respectivement de la production de NO et de prostaglandines E2 (PGE2) (Hoozemans et al., 2002; Saha and Pahan, 2006). La microglie activée peut contribuer à la dégénérescence du neurone dopaminergique par le relâchement de facteurs neurotoxiques comme le peroxyde d'hydrogène et des cytokines (TNF- α et IL-1 β). Les cytokines peuvent à leur tour activer des récepteurs de la cascade apoptotique dans le neurone dopaminergique et favoriser l'induction d'iNOS et de COX-2 chez la microglie (figure 1.22). Ce processus mène à l'accroissement en NO et en ROS qui peuvent endommager l'ADN, les protéines et les lipides (Whitton, 2007).

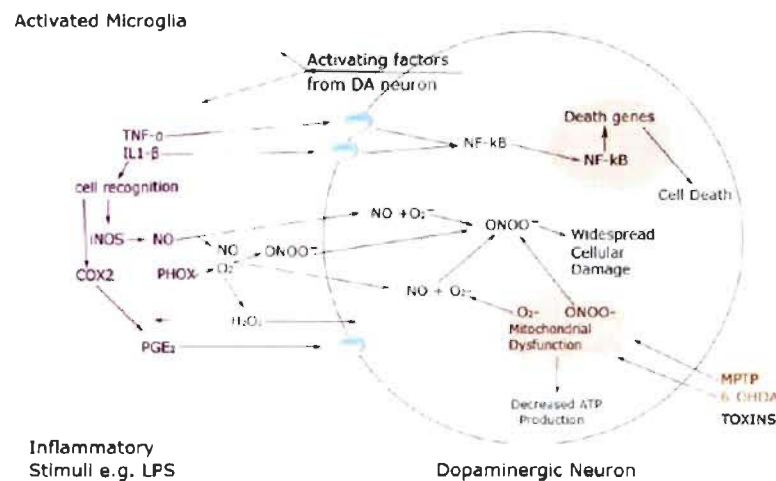


FIGURE 1.22 : Schéma simplifiée de l'interaction entre la microglie et le neurone dopaminergique (Whitton, 2007).

Ainsi, une fois tout ce cercle vicieux enclenché, la mort neuronale via le processus inflammatoire devient la finalité à cette interaction cellulaire.

1.3 Les thérapies et traitements de la MP

1.3.1 Les traitements chirurgicaux

Les premières tentatives chirurgicales consistaient en section de la voie motrice (pédoncule cérébral) par abord intracrânien direct, technique accablée d'une morbidité et d'une mortalité non-négligeables (Gildenberg, 1998). Vers 1950 et jusqu'en 1960, l'application des techniques stéréotaxiques permit des lésions beaucoup plus précises et nettement moins traumatisantes. Aux États-Unis, les pionniers de ce développement furent Cooper, Spiegel et Wycis (Cooper, 1953). En fait, la technique de choix, quasi exclusive de l'époque, était la **thalamotomie**. Ce traitement chirurgical consiste en une destruction, en condition stéréotaxique, d'une partie du noyau ventral latéral du thalamus ou du GP, ce qui permet de recouvrir presque complètement les symptômes de la MP (Svennilson et al., 1960). Ensuite, l'avènement de la L-dopa en 1968 ouvre la voie à la thérapie pharmacologique. Après plusieurs études internationales, sa commercialisation a eu lieu en 1973. Celle-ci a entraîné une chute des traitements neurochirurgicaux et ce point sera traité dans la section «traitements médicamenteux». La neurochirurgie reprit progressivement place en 1985 avec la **pallidotomie**. Il s'agit de la destruction du GPi. Ce traitement est très efficace pour réduire la rigidité, les tremblements et les dyskinésies.

Il a été établi que la thalamotomie et de la pallidotomie amènent plusieurs effets secondaires, comme des troubles sur le plan de la parole, de la marche ou cognitif. D'autre part, certaines observations ont mis en évidence que les stimulations électriques de basse fréquence, aggravait les tremblements, tandis que les stimulations à haute fréquence permettaient de diminuer l'amplitude des tremblements (Benabid et al., 1987). Donc, on a tenté d'établir

un traitement utilisant l'avantage des stimulations à haute fréquence. La **stimulation profonde du cerveau (SPC)** est une technique utilisant un courant électrique appliqué sur différentes parties du cerveau via des électrodes. La stimulation profonde fait, dans un premier temps, appel à de nouvelles cibles et d'autre part, n'entraîne pas la destruction de la cible comme dans les deux techniques précédentes.

Les cibles de la stimulation profonde sont: le noyau ventral intermédiaire du thalamus, le GPi et le noyau sous-thalamique. Le thalamus, principalement le noyau médian ventral, semble être particulièrement apte à contrôler les tremblements, mais n'élimine pas la bradykinésie. Le GPi est une cible de choix pour contrôler les chorées et les dyskinésies dystoniques liées à la thérapie à la L-dopa. Les noyaux sous-thalamiques semblent être les plus aptes à contrôler les dyskinésies. La SPC des noyaux sous-thalamiques, qui réduit la bradykinésie, permet une diminution des doses de L-dopa, impliquant aussi une diminution de la sévérité des dyskinésies (Olanow et al., 2000).

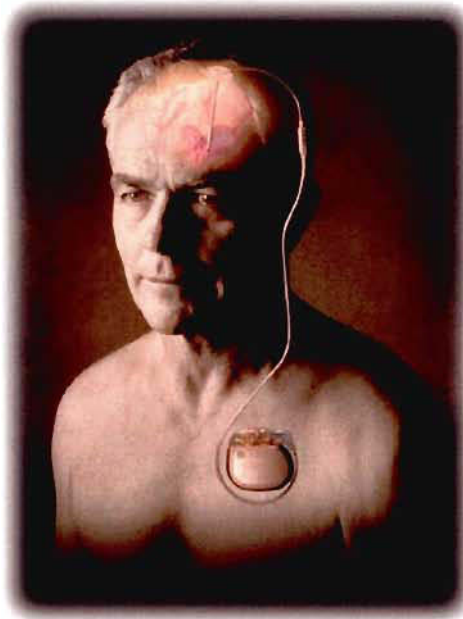


FIGURE 1.23 : Représentation d'un module régulateur utilisé dans la SPC.

1.3.2 Les traitements médicamenteux

Les traitements de la MP par des médicaments ne traitent que les symptômes de celle-ci. Une thérapie anti-MP par les médicaments doit soulager le patient de ses symptômes, mais ne mène aucunement à la guérison de la maladie. La **dopathérapie** demeure la plus puissante des méthodes de traitement et utilise les bienfaits de la L-dopa. En réalité, seule une faible partie de L-dopa administrée pénètre dans le cerveau. La plus grande partie, environ 95%, est rapidement décarboxylée et transformée en DA qui ne pénètre pas dans le cerveau (Pollak, 2004). Donc, la L-dopa est utilisée conjointement avec un inhibiteur de la dopa-décarboxylase, soit le bensérazide ou le carbidopa. Aux doses utilisées, ces inhibiteurs ne pénètrent pas dans le cerveau et, en conséquence, ils inhibent la dopa-décarboxylase périphérique mais pas la dopa-décarboxylase cérébrale. Ainsi la L-dopa est moins détruite à la périphérie, il y a donc moins de DA périphérique, moins d'effets secondaires périphériques. La L-dopa devient plus disponible pour pénétrer dans le cerveau. La L-dopa rendue dans le système nerveux peut être métabolisée par la dopa-décarboxylase du système nerveux en DA par les réactions de la figure 1.24.

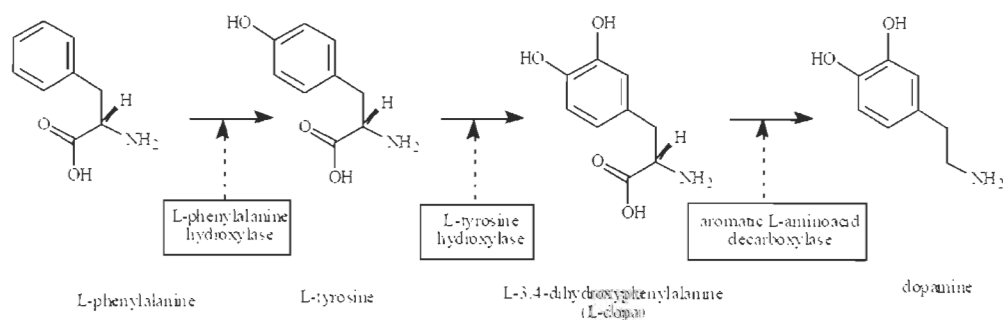


FIGURE 1.24 : Formation de la DA à partir de la L-dopa.

Cependant, l'utilisation de la dopathérapie mène environ 80% des patients qui développent des complications motrices, communément appelées les effets « on/off », qui aboutissent à des dyskinésies après plusieurs années de thérapie à la L-dopa (Encarnacion and Hauser, 2008).

Les **agonistes dopaminergiques** agissent principalement sur les récepteurs dopaminergiques striataux du neurone post-synaptique et il en résulte un établissement du fonctionnement de la voie nigro-striée. Ils miment ainsi l'action de la DA. Les agonistes dopaminergiques sont avantageux dans la thérapie anti-MP sous différents aspects. Ils ne requièrent pas de transporteurs actifs au niveau de leur absorption ou pour leur passage au travers de la BHE. Ils agissent directement sur leurs cibles (les récepteurs dopaminergiques) sans avoir à être synthétisés, excrétés ou stockés. Ils possèdent une plus longue demi-vie plasmique que la L-dopa (environ 6h). De plus, ils n'entrent pas dans la controverse de production de radicaux libres, ce qui est un risque du traitement à la L-dopa (Gille et al., 2002a; Gille et al., 2002b). En 1974, la bromocriptine a été choisie par les thérapeutes et elle demeure encore le traitement de choix (Calne et al., 1974). Selon la récente littérature, cet agoniste dopaminergique possède des propriétés antioxydantes. La bromocriptine active l'expression d'enzymes antioxydantes et favorise la capture des RL (Yoshikawa et al., 1994; Lim et al., 2008).

Il n'en demeure pas moins que leur efficacité est moindre que celle de la L-dopa, la fréquence des doses est plus grande, mais il ne cause aucun effet secondaire néfaste. Donc, la stratégie proposée est d'utiliser une association précoce d'un agoniste avec la dopathérapie car ces utilisations semblent permettre de retarder ou de limiter les effets secondaires à long terme de la L-dopa (Rascol et al., 2000; Reichmann, 2000).

1.3.3 Les nouvelles avenues

Dans la société vieillissante d'aujourd'hui, il est important de se sensibiliser à une alimentation dans laquelle on peut rechercher certains «outils» pour combattre les effets du vieillissement et du stress oxydant et ainsi en venir à réduire le risque de développer des maladies neurodégénératives. Les thérapies préventives ont essentiellement pour but de diminuer l'incidence de la MP. Il

existe plusieurs types de médecine complémentaire ou alternative (CAM). Les produits naturels sont la modalité la plus employée en terme de thérapie préventive et plus précisément, à un pourcentage de 18,9% (figure 1.25) (Yuan et al., 2006). Dans notre société, les gens ont un niveau de scolarité de plus en plus élevé, ce qui les rend aptes à participer de façon active dans la prise en charge du choix thérapeutique de leur santé. C'est avec ce type de personne qu'une thérapie complémentaire aux thérapies conventionnelles pourrait être bénéfique. Plusieurs molécules naturelles sont à l'étude pour leur effet neuroprotecteur, mais dans notre laboratoire on s'est concentré sur les estrogènes et les phytoestrogènes.

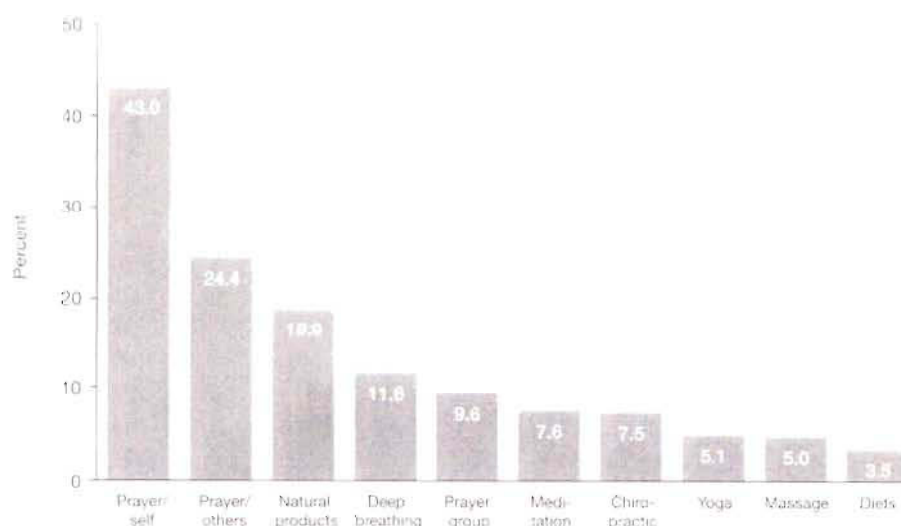


FIGURE 1.25 : Utilisation des produits naturels en tant que médecine complémentaire ou alternative (Yuan et al., 2006).

1.3.3.1 Les estrogènes

L'estrogène est l'hormone sexuelle féminine sécrétée par les ovaires (principalement le 17 β -estradiol, l'estrone et l'estriol (figure 1.26)) et que l'on retrouve aussi en doses beaucoup plus faibles chez l'homme. Cependant, l'action de l'estrogène n'est pas restreinte aux tissus qui sont impliqués dans les fonctions reproductives. En effet, l'estrogène influence aussi le développement, la croissance, la différenciation, la maturation et la fonction de différents tissus

tels que ceux du système nerveux périphérique et central (Behl, 2002). Une chute rapide et marquée du niveau d'estrogènes caractérise bien la ménopause. La ménopause comprend plusieurs effets secondaires et la thérapie de remplacement des estrogènes (TRE) a été introduite pour contrecarrer les principaux problèmes reliés à la ménopause. Mais qu'elle est le lien entre la TRE et la MP? Premièrement, il est véridique d'affirmer que dépassé l'âge de 55 ans, le risque des femmes de développer la MP augmente (Dluzen and Horstink, 2003). Les femmes qui ont subi une hystérectomie avant la ménopause sont aussi beaucoup plus à risque que la moyenne des femmes. Finalement, avec la TRE les femmes deviennent beaucoup moins à risque de développer la MP que les femmes n'en prenant pas (Currie et al., 2004).

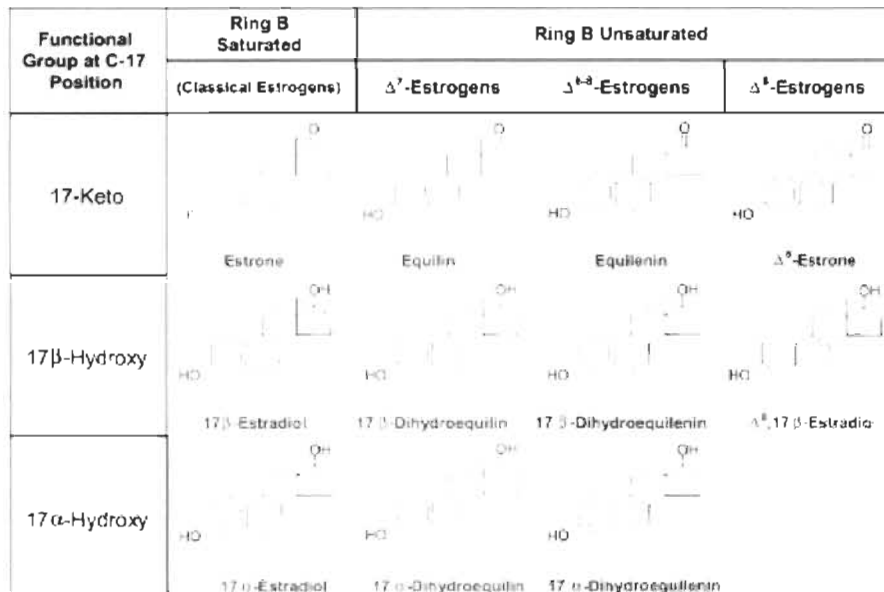


FIGURE 1.26 : Structure du 17 β -estradiol et de différents structures analogues (Bhavnani, 2003).

Les estrogènes diffusent librement à travers la bicouche lipidique de la membrane grâce à leur nature lipophile. Les effets des estrogènes résultent de leur interaction avec des récepteurs nucléaires qui agissent par l'intermédiaire des éléments de réponse estrogénique (ERE), conduisant à des modifications de la transcription de certains gènes et à la synthèse des protéines correspondantes. Outre leurs effets génomiques, les estrogènes (l'estradiol en particulier) ont aussi des effets rapides non-génomiques (directs) comme la

vasodilatation qui s'explique par activation directe des canaux potassiques de la membrane plasmique conduisant à une sortie de potassium et à une relaxation de la fibre lisse vasculaire. La figure 1.27 représente un modèle simplifié de l'action de l'estradiol.

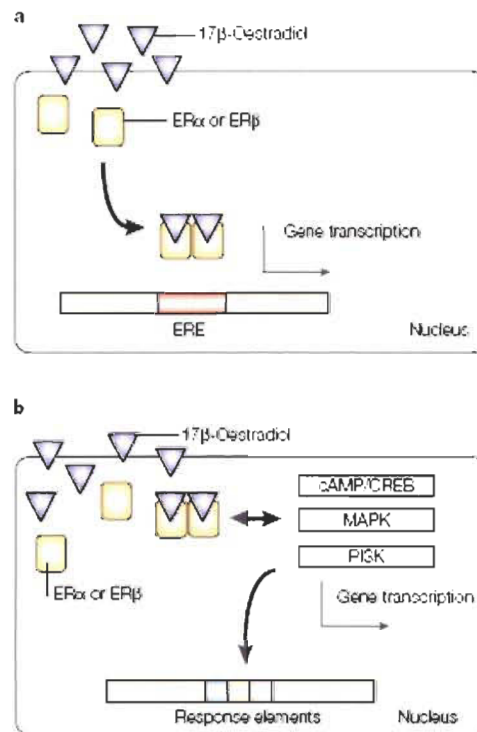


FIGURE 1.27 : Modèle simplifié du mode d'action de l'estradiol par **A)** la voie classique et **B)** la voie non-classique (Behl, 2002).

Ce récepteur est contenu dans un complexe hétéro-oligomérique. En **A)** Suite à la liaison de l'estradiol, il se produit un changement de conformation du récepteur et sa dimérisation. Ce dimère se lie à un ERE. Dans la région du promoteur d'un gène sensible aux œstrogènes, une unité de transcription est formée par l'interaction avec des coactivateurs qui permet l'initiation de la synthèse d'ARNm, puis de la réponse œstrogénique traduite sous forme de synthèse protéique (Aranda and Pascual, 2001). En **B)** Aussi, les récepteurs œstrogéniques peuvent agir très rapidement par une interaction directe dans une voie de signalisation. L'estradiol peut induire l'activité de l'adénylate cyclase, l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} , la stimulation de la phospholipase C et activer eNOS (Behl, 2002).

Aussi, les effets biologiques des estrogènes sont médiés via deux types de récepteurs aux estrogènes: le récepteur estrogénique α (ER α) et le récepteur estrogénique β (ER β). Le ER α et le ER β se retrouvent tous deux dans le cerveau. La figure 1.28 démontre la séquence génomique des récepteurs estrogéniques.

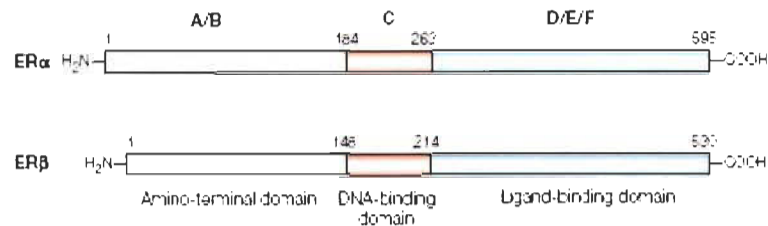


FIGURE 1.28 : Séquence génomique du ER α et du ER β (Behl, 2002).

Probablement que les deux types de récepteurs sont impliqués dans la neuroprotection médiée par les estrogènes, puisque le ER α (Gollapudi and Oblinger, 1999) et le ER β (Zhao and Brinton, 2007) semblent fournir des effets bénéfiques contre la mort neuronale. Le pouvoir neuroprotecteur des estrogènes est mis de l'avant chez les modèles de la maladie de la MP.

L'estrogène et la MP: Les estrogènes sont de puissants antioxydants. Leur structure phénolique, conduisant à la délocalisation des électrons, favorise leur capacité antioxydante. Des études antérieures de notre laboratoire ont démontré que les estrogènes permettent de réduire la toxicité et la formation de radicaux libres induites par le MPP⁺ et le paraquat sur des cellules PC12 neuronales en culture (Gelinas and Martinoli, 2002; Gelinas et al., 2004). Chez d'autres modèles cellulaires, l'estradiol semble diminuer l'effet du stress oxydant. En effet, des expériences sur des neurones dopaminergiques du mésencéphale démontrent que les deux isomères de l'estradiol ont la capacité de diminuer la quantité de RL (Sawada et al., 1998; Sawada and Shimohama, 2000). Plusieurs études dévoilent aussi qu'un pré-traitement avec un estrogène prévient la perte dramatique des neurones dopaminergiques striatales induites par le MPTP (Callier et al., 2000; Grandbois et al., 2000) et la

méthamphétamine (Yu and Liao, 2000). Tel que décrit précédemment, le proto-oncogène Bcl-2 protège les neurones de la toxicité induite par le MPTP et d'autres toxines. En effet, une sur-expression du gène Bcl-2 dans le neurone conduit à une protection accrue, de façon dose-dépendante, contre des neurotoxines spécifiques aux neurones dopaminergiques (Offen et al., 1998). La protéine Bcl-2 se situe sur la membrane mitochondriale et se dimérise pour empêcher le relâchement de CytC. Ce dernier est relâché lors de l'apoptose et est capable d'induire l'activation des caspases, étape finale de l'apoptose qui mène à la mort neuronale. L'ajout des estrogènes permettrait de diminuer le niveau d'apoptose des neurones et aussi d'augmenter le nombre de cellules Bcl-2 immunoréactives dans le cerveau de rats (Garcia-Segura et al., 1998).

Les estrogènes ont aussi le pouvoir de diminuer l'inflammation. En fait, il est démontré qu'un niveau physiologique d'estrogènes prévient l'activation de la microglie induite par le LPS et est associé à un blocage de la production de facteurs pro-inflammatoires, tels que NO et les PGE2 (Bruce-Keller et al., 2000; Vegeto et al., 2001). La figure 1.29 résume tous les mécanismes menant à la protection par l'estradiol.

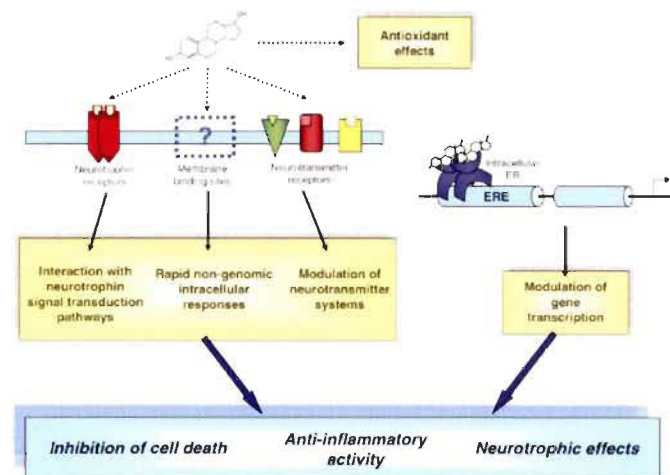


FIGURE 1.29: Résumé des différents mécanismes de protection de l'estradiol (Amantea et al., 2005).

Méfais des estrogènes : Les précédents paragraphes ont mis en évidence les effets bénéfiques de l'utilisation des estrogènes. Cependant, il n'en demeure pas moins que les estrogènes comportent aussi des effets négatifs. En effet, par des études cliniques sur des femmes subissant la TRE, les résultats ont démontré que beaucoup plus de femmes que la normale avaient développé des cancers hormono-dépendants, tels le cancer de l'utérus, du sein et des ovaires (Purdie, 2000). De plus, il y aurait l'augmentation du risque du cancer du poumon (Collins et al., 2005). Notre laboratoire oriente ses activités vers l'étude de molécules structurellement similaires aux estrogènes, mais avec beaucoup moins d'affinité pour les récepteurs estrogéniques. Il s'ensuit une absence de la prolifération cancéreuse. On compte quatre grandes classes de phytoestrogènes, les flavonoïdes, les isoflavonoïdes, les stilbènes et les lignans qui sont classés selon leur structure chimique. Dans notre laboratoire, les phytoestrogènes sont à l'étude depuis quelques années et leur propriété d'antioxydante, sur des cellules PC12 différenciées en neurones, a déjà été démontrée (Gelinas and Martinoli, 2002).

1.3.3.2 Le resvératrol

En 1940, le resvératrol a été isolé des racines de la plante *Veratrum grandiflorum*. Ensuite, c'est en 1963 que le resvératrol a été isolé des racines de la plante *Polygonum cuspidatum*, plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise et japonaise (Baur and Sinclair, 2006). Initialement, le resvératrol a été caractérisé comme phytoalexine, c'est-à-dire un composé toxique produit par la plante en réponse à une toxine ou un autre stress comme la privation en nutriments (Soleas et al., 1997). Son étude suscita une forte recrudescence en 1992 suite à la découverte de propriétés bénéfiques sur le système cardio-vasculaire du resvératrol présent dans le vin rouge par l'équipe de Siemann (Siemann and Creasy, 1992). Comme le démontre la figure 1.30, l'intérêt des chercheurs n'a pas cessé d'augmenter depuis.

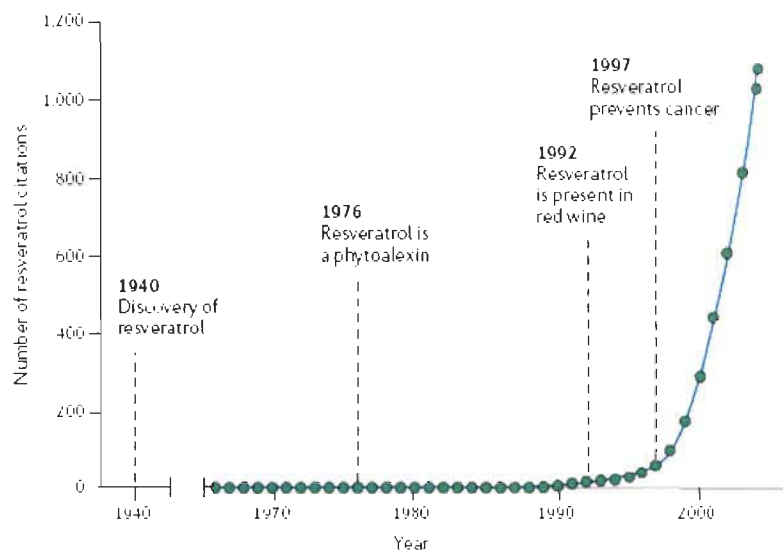


FIGURE 1.30 : Nombre de citations incluant le resvératrol sur Pubmed en fonction du temps (Baur and Sinclair, 2006).

Le resvératrol est un composé phénolique structurellement similaire aux stilbènes. Il est retrouvé sous 2 formes, c'est-à-dire un isomère *cis* et un isomère *trans* (figure 1.31).

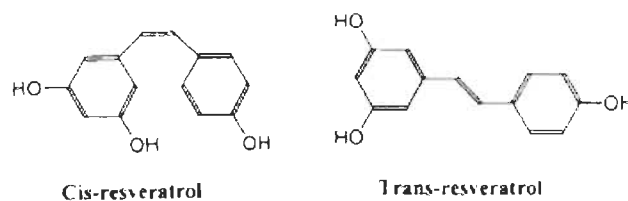


FIGURE 1.31 : Structure *cis* et *trans*-resvératrol.

La forme *cis*-resvératrol est considérée comme étant biologiquement inactive, mais de récentes évidences supportent que les deux formes du resvératrol soient biologiquement actives (Yanez et al., 2006). Il n'en demeure pas moins que la forme *trans*-resvératrol demeure la plus active des deux formes du resvératrol (Orallo, 2006). La forme *cis* n'est pas beaucoup considérée, car elle n'est pas très stable et elle est transformée presque immédiatement en forme *trans*. Le resvératrol représente 5 à 10 % de la biomasse de la peau du raisin rouge et il est contenu dans le vin rouge et les jus de raisin dans des concentrations entre 0,1 et 14,3 mg/L (Ribeiro de Lima et al., 1999; Baur and

Sinclair, 2006). Le resvératrol possède de nombreuses propriétés bénéfiques pour l'homéostasie, dont plusieurs seront discutées dans les prochains paragraphes.

Le resvératrol et le cancer: En 1997, l'équipe du chercheur Jang a publié une étude rapportant l'habileté du resvératrol à inhiber la prolifération cancéreuse. Cette étude, faite chez un modèle de souris, suggère une diminution de la formation des tumeurs suite à une exposition au resvératrol (Jang et al., 1997). De plus, cette étude suggère un effet inhibiteur du resvératrol sur les événements associés à l'initiation, à la promotion et la progression du cancer. À faibles doses, le resvératrol semblerait thérapeutique aussi dans un modèle de rat pour le cancer du colon (Tessitore et al., 2000).

Le resvératrol possède aussi la faculté d'inhiber l'activité enzymatique de plusieurs formes de la COX-2. En effet, une inhibition à long terme de la COX-2 réduit significativement les risques de développer des cancers. Aussi, la délétion du gène qui code pour la COX-2 semble protéger du cancer colorectal chez un modèle de souris (Oshima et al., 1996). Il est bien connu que les ROS ont un rôle sur l'initiation et la progression des cancers par les dommages qu'ils causent à l'ADN et aux autres macromolécules (Gromadzinska and Wasowicz, 2000). *In vivo*, sur des modèles du cancer, le resvératrol augmente la capacité antioxydante et diminue la peroxydation lipidique (Miura et al., 2003; Wenzel et al., 2005). Cette chémoprotection par le resvératrol provient principalement de sa capacité à induire l'apoptose de lignées cancéreuses (figure 1.32).

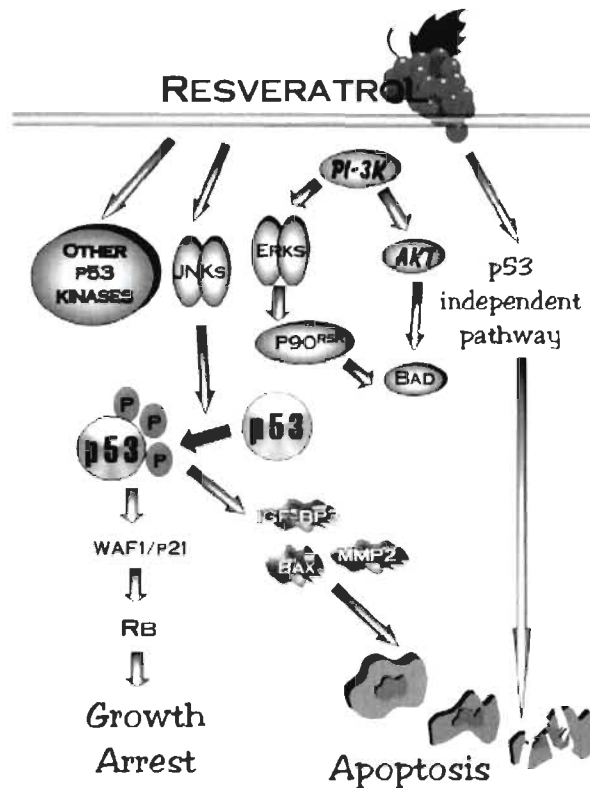


FIGURE 1.32 : Voies impliquées dans l'induction de l'apoptose par le resvératrol (Dong, 2003).

Une des voies impliquées dans l'initiation de l'apoptose serait la voie de p53, un gène très important dans la suppression de tumeurs. Sur des cellules normales ($p53^{+/+}$), le resvératrol est capable d'induire l'apoptose, mais sur une lignée cellulaire déficiente en p53 ($p53^{-/-}$), le resvératrol est incapable d'induire l'apoptose de ces cellules (Huang et al., 1999).

Dans notre projet, l'avantage d'utiliser le resvératrol plutôt que les estrogènes comme thérapie préventive à la MP et même comme traitement post-ménopausal, est qu'il n'induit pas la formation de cancers hormono-dépendants, tels les cancers du sein ou de l'utérus (ASRM, 2008) Plusieurs études ont révélé que le resvératrol lie les récepteurs estrogéniques avec beaucoup moins d'affinité que les estrogènes, soit de 7000 à 10000 fois moins, ce qui réduirait beaucoup l'initiation de cancers hormono-dépendants (Bowers et al., 2000)

Le resvératrol et les maladies cardio-vasculaires : La consommation régulière de vin rouge est souvent reliée avec le «Paradoxe Français» (Renaud and de Lorgeril, 1992). En effet, les Français ont une alimentation riche en acides gras saturés, mais pourtant ils ont une incidence de maladies cardio-vasculaires des plus faibles au monde, probablement due à leur consommation quotidienne en vin rouge. Le vin rouge et les extraits de raisins sont reconnus pour leur capacité à diminuer l'agrégation plaquettaire (Bertelli et al., 1995), à promouvoir la vasodilatation (Fitzpatrick et al., 1993), à diminuer la peroxydation lipidique (Baur and Sinclair, 2006) et à diminuer l'oxydation des lipoprotéines à faible densité (Belguendouz et al., 1997).

Le resvératrol et l'inflammation : Plusieurs aliments ont un pouvoir anti-inflammatoire et depuis tout récemment, on s'intéresse au pouvoir anti-inflammatoire du resvératrol dans plusieurs systèmes. Les études chez les adipocytes démontrent que le resvératrol inhibe le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) et par conséquent l'activation de la voie de signalisation de NF- κ B. On y retrouve aussi la réduction significative de l'expression de cytokines (Gonzales and Orlando, 2008). De plus, le resvératrol a un impact significatif sur l'inflammation induite par la toxine bactérienne LPS. En effet, il diminue le niveau d'ARNm et protéique d'iNOS. Il influe aussi à la baisse la production de TNF- α (Meng et al., 2008). On affirme que le système enzymatique (principalement COX-2 et les lipoxygénases), impliqué dans la synthèse des facteurs pro-inflammatoires, est modulé par le resvératrol (figure 1.33) (de la Lastra and Villegas, 2005).

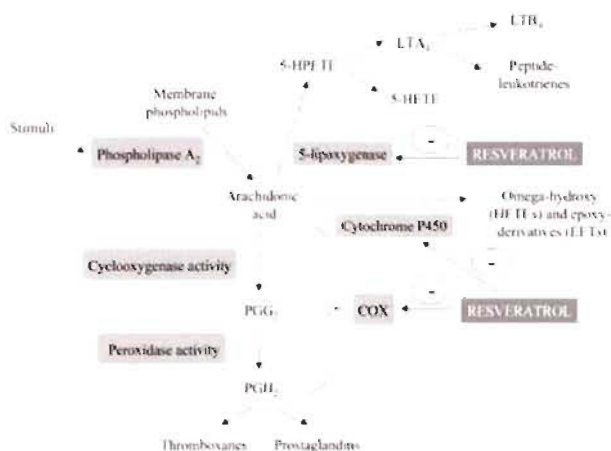


FIGURE 1.33 : Effet du resvératrol sur le système enzymatique impliqué dans la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires (de la Lastra and Villegas, 2005).

Le resvératrol et le vieillissement : Les sirtuines sont une famille de déacétylases dépendantes du NAD^+ . Chez les mammifères, on retrouve sept types différents de sirtuines (SIRT-1 à 7) et dont SIRT-1 qui a une localisation principalement nucléaire et des implications dans les mécanismes du vieillissement. Des études chez des souris «knockout» pour SIRT-1 ont mis en évidence des déficiences du développement, tel qu'un faible taux de survie et une espérance de vie diminuée en comparaison aux souris «wild-type» (McBurney et al., 2003). De plus, une surexpression de SIRT-1 et un traitement au resvératrol diminuent de façon marquée l'activation de la voie de signalisation de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, stimulé par le peptide β -amyloïde dans le cadre de la maladie d'Alzheimer (Yeung et al., 2004).

Débat apoptotique/anti-apoptotique : On peut se questionner sur le véritable effet du resvératrol. Le cycle cellulaire des cellules cancéreuses est complètement débalancé et elles se divisent de façon anarchique. Les cellules neuronales, quant à elles, sont des cellules différenciées et leur processus de division cellulaire est arrêté en G_0 . Ainsi, on pourrait tout simplement croire que les cellules ne répondent pas de la même façon au resvératrol. La réponse est probablement adaptée au bien être de l'organisme : les cellules cancéreuses

meurent, alors que les neurones sont protégés contre un stress. Pour ajouter à ces affirmations, des résultats complémentaires sont présents à la page 61.

1.3.3.3 La quercétine

Le deuxième polyphénol à l'étude lors de ma maîtrise est la quercétine. La quercétine (figure 1.34) est un flavonoïde retrouvé en quantité raisonnable dans notre alimentation quotidienne. On la retrouve dans la pomme, l'oignon, le thé vert et les arachides.

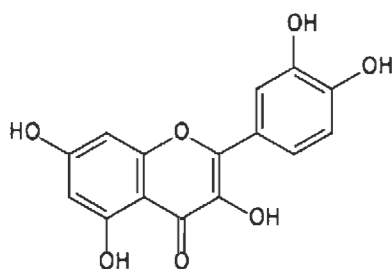


FIGURE 1.34 : Structure de la quercétine.

Certaines transformations métaboliques mènent à la formation de métabolites actifs de la quercétine (figure 1.35). Chez l'homme, la quercétine peut-être transformée en un composé méthylé par les fibroblastes; composé aux propriétés fort importantes dans la protection cellulaire (Williams et al., 2004).

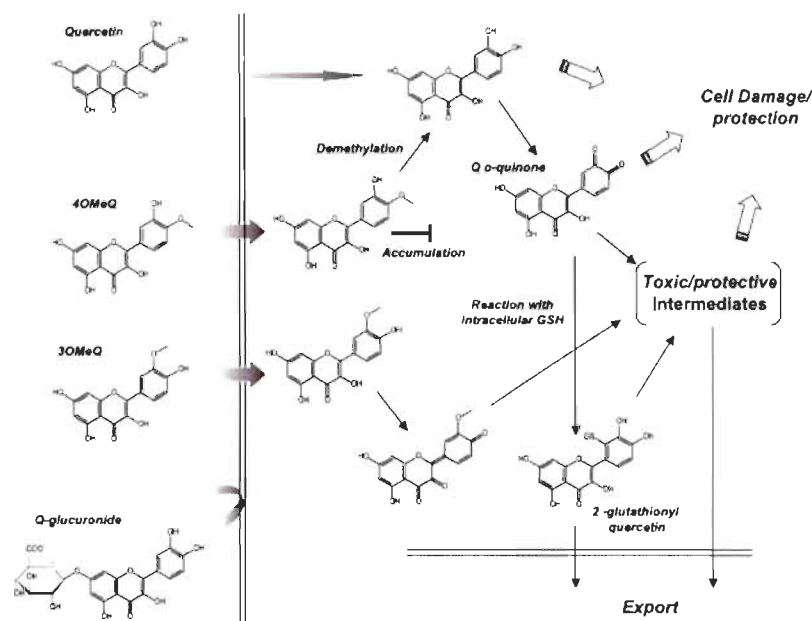


FIGURE 1.35 : Sommaire du métabolisme cellulaire de la quercétine et de ses dérivés méthylés (Williams et al., 2004).

La quercétine est beaucoup moins étudiée que le resvératrol, mais il n'en demeure pas moins que la quercétine possède des effets métaboliques très intéressants qui seront discutés dans les prochains paragraphes.

L'activité antioxydante : Les diètes riches en fruits et en légumes ont un effet protecteur contre plusieurs types de maladies (Smith and Luo, 2003; Heo and Lee, 2004). La quercétine est fortement reconnue pour son activité antioxydante. Une étude du pouvoir antioxydant de la quercétine et de différents complexes de ce polyphénol a été réalisée par la mesure de l'activité antioxydante par la méthode du DPPH. Ceci consiste à la capacité de l'antioxydant à neutraliser (donner un hydrogène) un ion donné ou à sa capacité de chélater les RL par spectroscopies UV-visible. On mesure l'absorbance à 515 nm en fonction du temps pour évaluer la capacité antioxydante de la quercétine. La baisse de l'absorbance corrèle avec un bon pouvoir antioxydant de la molécule. L'étude a démontré que la quercétine possède un des meilleurs pouvoirs antioxydants parmi plusieurs polyphénols (Bukhari et al., 2008). La

figure 1.36 qui suit donne l'analyse de la baisse d'absorbance à 515 nm en présence de quercétine.

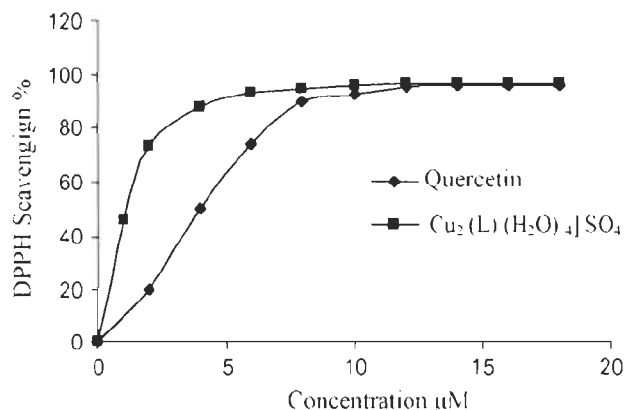


FIGURE 1.36: Analyse de la baisse d'absorbance à 515 nm de la solution de DPPH en présence de quercétine et du complexe Cu-quercétine (Bukhari et al., 2008).

La quercétine possède aussi la propriété de chélater certains métaux de transitions, tel le fer (Guo et al., 2007). Le fer est impliqué dans la réaction de type Fenton avec le peroxyde d'hydrogène pour produire les RL. Ainsi, la forte capacité de la quercétine à capter le fer permet de réduire la formation de RL. Il semble que le groupe cathécol de la quercétine participerait à la chélation des métaux pour ainsi, contribuer aux propriétés antioxydantes de la quercétine. De plus, la quercétine diminue significativement la peroxydation lipidique (Zhao et al., 2004).

L'activité anti-cancéreuse : La quercétine possède une activité anti-proliférative par sa capacité à inhiber la transformation et la prolifération cellulaire. Les protéines kinases sont impliquées dans l'activité anti-proliférative de la quercétine. Plus particulièrement, la quercétine inhibe la certaines kinases comme la protéine kinase C. Elle inhibe aussi certaines sérine/thréonine kinases, ce qui a pour effet de moduler les voies de signalisation de la survie cellulaire PI-3K/Akt et ERK1/2 et inhibe aussi la voie des cyclines Cdk2 impliquée dans la division cellulaire (Casagrande and Darbon, 2001). De plus, plusieurs études analysent l'effet chémoprotecteur de la quercétine. Par

exemple, l'administration pendant quatre semaines d'une diète contenant 2% de quercétine, chez des souris, mène à la chute de l'expression d'une aberration chromosomique directement reliée à l'augmentation du facteur de risque du cancer (Sengupta et al., 2001).

L'activité anti-apoptotique : Il y a encore peu de recherches qui tentent d'établir le potentiel anti-apoptotique de la quercétine. En fait, les auteurs Ishakawa et Kitamura ont réussi à démontrer l'effet anti-apoptotique de la quercétine suite à l'induction de l'apoptose par un traitement au peroxyde d'hydrogène. Les auteurs ont centré leur recherche sur l'influence de la quercétine sur la famille des MAP kinases et plus précisément c-JUN, ERKs et la MAP kinase p38. La suppression de l'activation de c-JUN et d'ERK-c-FOS (dans la voie de signalisation AP-1) est responsable de l'activité anti-apoptotique de la quercétine (Ishikawa and Kitamura, 2000).

1.4 Objectifs de recherche

La MP est une maladie neurodégénérative de cause encore inconnue. On suspecte essentiellement le stress oxydant, le dysfonctionnement mitochondrial et la neuroinflammation comme déclencheurs des symptômes de la maladie. À ce jour, les traitements pharmacologiques sont essentiellement symptomatiques. D'autre part, un moyen possible de prévenir la MP est d'utiliser le pouvoir antioxydant intrinsèque de certaines substances naturelles.

Dans ce contexte, l'objectif principal du projet de maîtrise était de vérifier que le resvératrol et la quercétine pouvaient réduire directement le niveau de mort apoptotique induit par un oxydant sur des neurones dopaminergiques en culture. Deuxièmement, afin de bien comprendre la protection apoptotique du resvératrol et de la quercétine, nous avons étudié les mécanismes cellulaires impliqués dans cette protection contre l'apoptose. Il s'agissait spécifiquement

d'étudier le mécanisme mitochondrial Bax/Bcl-2 et la relâche mitochondriale d'éléments initiateurs de la cascade apoptotique : CytC et AIF.

La réduction du stress oxydant, par les polyphénols, permettrait de réduire la mort cellulaire générée par ce processus retrouvé dans la MP et d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer.

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Présentation de la lignée cellulaire PC12

La lignée cellulaire PC12 a été utilisée du projet de maîtrise. Les PC12 sont des cellules provenant de phéochromocytomes de la surrenale de rat. Ces cellules sont dites catécholaminergiques puisqu'elles produisent la DA, la noradrénaline et l'adrénaline. La différenciation des cellules PC12 en une lignée neuronale uniquement dopaminergique est réalisée avec l'ajout de facteur de croissance du nerf (NGF) (figure 2.1) (Greene, 1978). De plus, les PC12 différenciées produisent des neurofilaments (Parysek and Goldman, 1987) et expriment les ER α et ER β de même que le DAT (Gelinas and Martinoli, 2002). Les cellules PC12 sont maintenues en vie dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère humide à 5% de CO₂. Les cellules non différenciées sont cultivées dans un milieu de culture RPMI-1640 supplémenté avec 5% de sérum de cheval (HS) décomplémenté à la chaleur, et 10% de sérum foetal de bovin (FBS), décomplémenté à la chaleur. Les sérums sont dits « strippés ». Ils sont exempts de toutes sources de composés estrogéniques. Le milieu est changé tous les deux jours. La différenciation des cellules PC12 se fait pendant neuf jours par l'ajout de 50 ng/mL de NGF dans un milieu de culture RPMI-1640 contenant 1% de FBS, aussi changé à tous les deux jours. Ce milieu de culture, limité en sérum, est adéquat pour éviter la division des cellules et permettre aux cellules d'entrer en phase de différenciation.

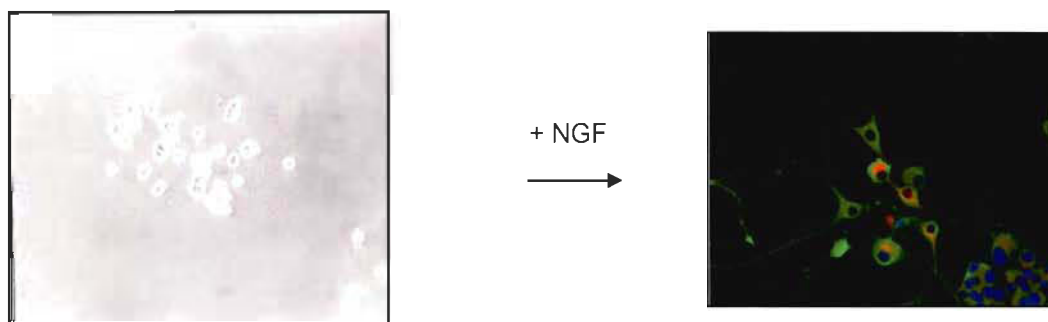


FIGURE 2.1 : Représentation des cellules PC12 non-différenciées (à gauche) et des cellules PC12 différenciées (à droite).

2.2 Influence du resvératrol et de la quercétine sur la mort apoptotique induite par une neurotoxine : le MPP⁺

Matériels utilisés : Les cellules PC12 ont été achetées de la compagnie ATCC (Rockville, MD). De la compagnie Sigma, on s'est procuré plusieurs produits : le MPP⁺, le resvératrol, la quercétine, le NGF et le Hoechst 33342. La trousse de détection de l'ADN fractionné provient de Chemicon International. Finalement, la trousse Terminal d-UTP nicked-end labelling (TUNEL) a été achetée chez Roche (Canada, Québec).

Préparations des solutions : Le resvératrol et la quercétine ont été dissouts dans l'éthanol anhydre à une concentration de 4 mM (solution mère) et conservés à -20°C. Avant le début de chaque essai, des dilutions en série ont été élaborées (dans du milieu de culture) pour arriver à une concentration finale de 0,2 µM en resvératrol et en quercétine (pour une concentration finale de 0,1 µM dans les puits de culture). La solution de MPP⁺ était fraîchement préparée avant l'exécution de chaque traitement à une concentration de 5 mM (solution mère). Des dilutions en série ont été effectuées pour arriver à une solution de travail à 500 µM.

Traitements des cellules PC12 : Pour vérifier la capacité du resvératrol et de la quercétine à diminuer la mort neuronale apoptotique, nous avons effectué

divers traitements des cellules PC12 cultivées dans des plaques 96 puits ou des plaques 24 puits. Les cellules PC12 différenciées ont été prétraitées (P-T) avec l'un ou l'autre des polyphénols à l'étude à une concentration finale de $0,1\mu\text{M}$. Trois heures plus tard, la mort cellulaire a été induite par l'ajout d'une toxine oxydante, tout particulièrement le MPP^+ . Le traitement (T) au MPP^+ s'effectue pour une période de 24 heures et on maintient la concentration de resvératrol ou de quercétine. La figure 2.2 représente bien la stratégie expérimentale suivie.

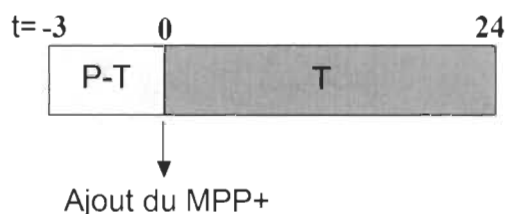


FIGURE 2.2: Stratégie pour l'élaboration des traitements de cellules.

Marquage des cellules en apoptose par TUNEL et immunofluorescence de la caspase-3 activée : Cette première portion de ma recherche était de mettre en évidence l'effet du resvératrol et de la quercétine sur la fragmentation de l'ADN et l'activation de la caspase-3. Pour ce faire, la culture de cellules PC12 différenciées s'est faite comme décrite dans la section 2.1, et ce à un détail près. Les cellules ont plutôt été cultivées sur des lamelles. Le traitement a été effectué conformément à la section 2.1 (ci-haut). À la fin du 24 heures de traitement, les cellules ont été fixées pendant 1 heure à 4°C avec de la paraformaldéhyde 4%. Ensuite, nous avons suivi la séquence suivante : anticorps primaire anti-caspase-3 activée (1/500, 4h à 4°C), lavage avec une solution de PBS filtré, anticorps secondaire lié à la molécule cy3 (1/500, toute la nuit) et enfin marquage des cellules en apoptose. La mise en évidence des cellules en apoptose s'est faite par la technique du TUNEL dont un schéma est présenté à la figure 2.3. En effet, comme expliqué précédemment, l'apoptose est définie par la fragmentation de l'ADN. La technique de TUNEL consiste en l'ajout d'un composé à l'extrémité 3'OH libre des fragments d'ADN produits. Les composés ajoutés sont des dUTPs liés à la fluorescéine et ce par la Tdt (transférerase de

déoxynucléotides terminaux). De ce fait, les fragments d'ADN deviennent facilement visibles en microscopie à fluorescence (soit à une longueur d'onde d'excitation de 450nm et d'émission de 515nm).

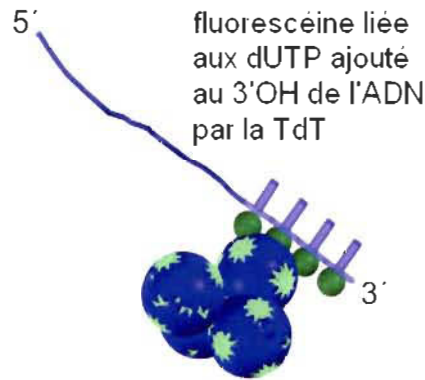


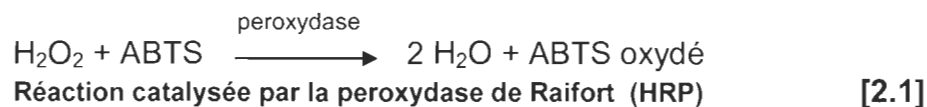
FIGURE 2.3 : La technique d'ajout de dUTP dans la technique de TUNEL.

Ainsi, il devient facile de cibler les cellules en apoptose de celles qui ne le sont pas, car ces dernières n'émettront pas de fluorescence. De plus, pour évaluer précisément le pourcentage de cellules en apoptose dans chaque condition de traitement, les noyaux totaux sont mis en évidence avec le DAPI (ou Hoescht 33342). Ce dernier s'insère entre les A et T de l'ADN et donne une coloration bleue à toutes les cellules. Donc, il sera possible d'établir le rapport des cellules en apoptose sur les cellules totales.

En somme, l'immunofluorescence consistait à effectuer 3 marquages bien précis. Il s'agit du marquage des noyaux totaux, le marquage spécifique de ceux en apoptose et enfin de vérifier la présence de la caspase-3 activée chez les cellules en apoptose. Pour ce faire, les lamelles ont été montées sur les lames à l'aide de la trousse «Molecular Probes ProLong Antifade» d'Invitrogen. Les lamelles ont été observées avec un microscope à fluorescence Leitz et les images ont été acquises à l'aide d'une caméra Q-imaging de Nikon. Les cellules ont été considérées en apoptose quand elles étaient positives pour la caspase-3 activée et le marquage au TUNEL. L'analyse du nombre de cellules totales et en

apoptose était effectuée avec le logiciel NIS-Element 2.2, et ce sur 100 différents champs optiques.

Détermination de l'ADN fragmenté par ELISA : Ce test se base sur la dénaturation sélective de l'ADN des cellules en apoptose par la formamide et la détection de l'ADN dénaturé avec un anticorps monoclonal contre les fragments d'ADN simple brin (ADNss). La formamide est un agent dénaturant doux qui dénature spécifiquement l'ADN des cellules en apoptose. Il n'a aucun effet sur l'ADN des cellules en nécrose et sur l'ADN brisé en absence d'apoptose (Frankfurt and Krishan, 2001). Pour déterminer, de façon plus précise, l'influence du resvératrol et de la quercétine sur la fragmentation de l'ADN, j'ai effectué des tests ELISA reconnaissant spécifiquement les bris d'ADN caractéristiques du phénomène d'apoptose. La mise en culture est faite dans des plaques 96 puits et les traitements des PC12 ont été réalisés conformément aux explications précédentes. Suite aux traitements de 24 heures, les plaques sont centrifugées et le surnageant est éliminé. On fixe les cellules avec le méthanol, puis une fois les puits complètement secs en méthanol, on peut procéder à la dénaturation par la formamide. Ensuite, on procède au blocage des sites non-spécifiques avec le lait 3% non gras et on ajoute pour 30 minutes la solution d'anticorps (contenant l'anticorps primaire qui reconnaît les fragments spécifiques de l'apoptose et l'anticorps secondaire lié à une peroxydase de Raifort). La formule suivante représente bien la réaction catalysée par cette enzyme.



La solution ABTS contient du 2,2'-AZINO-bis [3-éthylebenziazoline-6-sulfonique acide]. La peroxydase catalyse l'oxydation de la solution ABTS et il y a apparition d'une coloration verte. L'absorbance peut ensuite être prise à 405 nm pour les différentes conditions. Ce test possède un contrôle positif (des fragments d'ADN qui donnent une absorbance maximale) et un contrôle négatif

(puit traité avec la S1 nucléase qui donne l'absorbance minimale) pour s'assurer de la qualité du test effectué.

2.3 Mécanismes cellulaires impliqués dans la protection, par le resvératrol et la quercétine, de l'apoptose induite par le MPP⁺.

Matériels utilisés: Les colonnes d'extraction d'ARN total GenElute, le Hot MasterMix, des dNTPs, l'anti-TH et l'anti-VDAC ont été commandés chez Sigma (Ontario, Canada). Les amorces ont été synthétisées chez Sigma Genosys (Ontario, Canada). La Transcriptase Réverse et son tampon de réaction ont été achetés chez New England BioLab (MA, Etats-Unis). Les différentes trousse d'extraction des protéines sont le « Nuclear Extraction Kit » et le « Mitochondrial Fractionation » d'Active motive. Les anticorps proviennent de chez Cederlane pour Bax et de chez Santa Cruz Biotechnology pour Bcl-2, AIF et HDAC1.

Préparations des solutions: La préparation des solutions est entièrement similaire à la description de la section 2.1 pour le resvératrol, la quercétine et le MPP⁺. Les solutions relatives aux différentes étapes d'extraction sont fraîchement préparées tout juste avant le début de chacune des expériences.

Traitements des cellules PC12: Les traitements ont été effectués conformément aux explications de la section 2.1, mais cette fois dans des plaques de 6 puits seulement.

Le RT-PCR : Suivant les traitements, l'ARN a été dosé par spectrométrie puis 1 µg de l'ARN total a été rétrotranscrit en utilisant 25 U de transcriptase reverse, 1,5 µM de dNTP et 10 µM d'amorce aléatoire. Suite à l'obtention de l'ADN complémentaire, chacune des conditions a été utilisée pour examiner l'expression de Bax et de Bcl-2 par la technique de PCR. Les séquences des amorces nécessaires à l'amplification de ces gènes se retrouvent au tableau 2.1.

Gènes ciblés	Poids moléculaire (pb)	Séquences des amorces	Température hybridation (°C)	Référence
Bcl-2	242	5'-CTCGTCGCTACCGTCGTGACTTCG-3' 5'-CAGATGCCGGTTCAGGTA CT CAGTC-3'	60	(Charalampopoulos et al., 2004)
Bax	208	5'- TGC AGA GGA TGA TTG CTG AC-3' 5'- GGA GGA AGT CCA GTG TCC AG-3'	50	(Ando et al., 2005)
18s	150	5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3' 5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3'	50 ou 60	(Schmittgen and Zakrajsek, 2000)

Tableau 2.1 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des trois gènes.

Les amplicons attendus ont un poids moléculaire de 242 bp, 208 bp et 150 bp, respectivement. Le protocole d'amplification consiste en une dénaturation initiale de 5 min à 94°C, suivi de 25 cycles d'une dénaturation à 94°C pour 1 min, suivi d'une hybridation à 50 ou 60°C pour 1 min et une extension à 70°C pour 30 secs. L'amplification a été effectuée avec un Bio-Rad iCycler system. Pour s'assurer que la quantification était effectuée dans la phase exponentielle, chaque cible a été amplifiée selon un gradient de cycles. Le nombre final de cycles a été choisi selon l'accumulation logarithmique du produit d'amplification, comme décrit précédemment (Rousseau et al., 2002). Le produit de PCR (10 µL) est ensuite séparé sur un gel d'agarose 1,5%, dans du TAE (40 mM Tris-acétate, 1 mM EDTA, pH 8.0) et coloré au « SYBR Safe DNA gel stain ». C'est un agent qui se lie à l'ADN et permet la visualisation lorsque mis sous UV (son pic d'absorption est à 280 nm et son émission à 530 nm). Les images ont été acquises à l'aide d'un système d'imagerie FluorChem XP d'Alpha Innoteck et l'analyse de l'intensité des bandes a été réalisée avec le logiciel du FluorChem XP (version 4.0 de l'AlphaEase FC). Toutes les analyses ont été corrélées avec l'amplicon du contrôle interne, la sous-unité 18s du ribosome, pour vérifier que la même quantité d'ARN était utilisée lors de l'étape de RT.

Immunobuvardage de type Western : Pour l'immunobuvardage de type western, les protéines ont été extraites à l'aide de deux différentes trousse. Il s'agit de la trousse «Nuclear Extraction Kit» et le «Mitochondrial Fractionation» d'Active Motive. Suivant les différentes étapes d'extraction, j'ai obtenu des protéines totales ou cytoplasmiques/nucléaires avec le Nuclear Extraction kit et les protéines mitochondriales/cytoplasmiques avec la trousse Mitochondrial Fractionation. Suite à plusieurs rinçages, les protéines sont dissoutes dans 50 μ l de la solution de lyse. La concentration en protéines a été déterminée par un dosage avec le «BCA Protein Assay Kit », de Pierce. Une quantité égale de protéines (20 μ g) a été ajoutée à un gel 12% en polyacrylamide et a subi une séparation électrophorétique (120V, 120min). Ensuite, les gels de polyacrylamide ont été transférés sur des membranes de polyfluorure de vinylidène (PVDF de 0,22 μ m) à 60V pendant 2 heures. Ces membranes de nylon sont ensuite bloquées dans du lait écrémé 5% et incubées avec l'anti-Bax (1:100), l'anti-Bcl-2 (1:100) et l'anti-AIF (1:100) pour 24 heures à la température de la pièce. Après, un anticorps secondaire, couplé à une peroxydase, a été ajouté pour une période de 2 heures et à une concentration de 1:1000. La bonne séparation des protéines cytoplasmiques/nucléaires a été vérifiée par l'incubation des membranes avec l'anti-TH (1 :2000) pour les fractions cytoplasmiques et avec l'anti-HDAC1 (1 :200) pour les fractions nucléaires. La qualité des protéines provenant de l'extraction mitochondriale ont été contrôlés avec l'anti-TH (1 :2000) pour les fractions cytoplasmiques et avec l'anti-VDAC (1 :100) pour les fractions mitochondriales. Les résultats de chimiluminescence ont été acquis et analysé avec l'appareil FluorChem XP d'Alpha Innoteck.

2.4 Analyse statistique

Les différences statistiques entre les groupes étaient déterminées par l'analyse de la variance (ANOVA), suivie d'un post test de type Student avec le logiciel GraphPad Instat. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M. à partir de trois expérimentations différentes. Les moyennes associées à des symboles différents sont statistiquement différentes.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Dans cette section, nous présentons des résultats complémentaires aux résultats décrits dans la section « Article ». Ceci dans le but de mieux expliquer ma démarche scientifique.

3.1 Détermination des concentrations de resvératrol et de quercétine à utiliser lors des différents tests.

Les concentrations de resvératrol et de quercétine utilisées pour les traitements proviennent de doses-réponses effectuées dans le cadre des expérimentations de Sylvie Gélinas (ancienne étudiante au doctorat du laboratoire).

3.2 Détermination de la concentration de MPP⁺ pour l'induction de l'apoptose.

Le type d'expériences réalisées dans ce projet de maîtrise a nécessité l'élaboration d'une courbe dose-réponse du MPP⁺ sur l'induction de l'apoptose, et ce par la technique de TUNEL. De plus, cette concentration demeure en accord avec la littérature (Lee et al., 2006). On peut constater à la figure 3.1 que la dose de MPP⁺ induisant environ 45% d'apoptose est de 500µM.

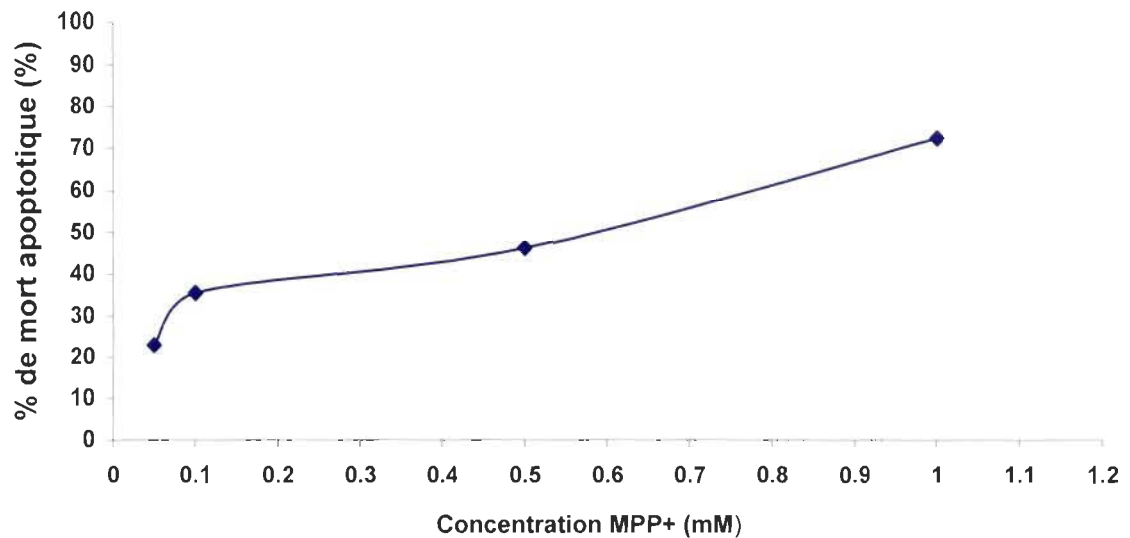


FIGURE 3.1 : Induction de l'apoptose par 500 μ M de MPP⁺.

3.3 Effet du resvératrol sur la lignée cellulaire PC12 naïves (de phénotype cancéreux).

L'effet du resvératrol a aussi été vérifié sur les cellules PC12 non-différenciées. Ces tests avaient pour but de déterminer l'effet du resvératrol sur une même lignée cellulaire qui peut être cancéreuse et neuronale selon les conditions de culture. On peut constater à la figure 3.2 que le resvératrol induit la mort cellulaire des cellules PC12 de type cancéreuses.

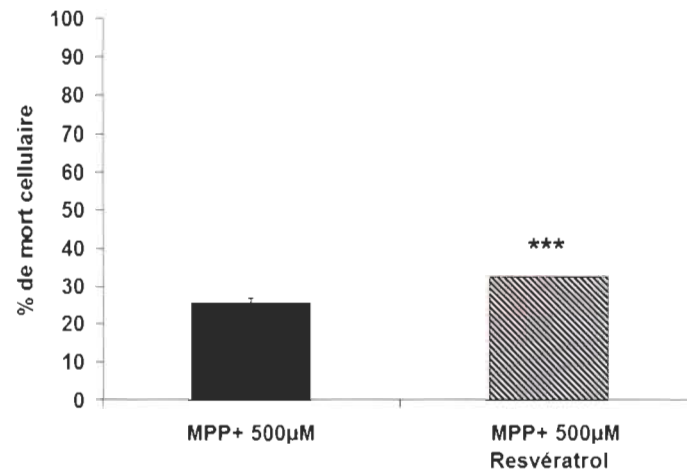


FIGURE 3.2 : Induction de l'apoptose par 500 μM de MPP^+ et effet non-protecteur du resvératrol (sur des cellules PC12 naïves).

Donc, on pourrait conclure que l'effet du resvératrol est probablement adapté au type cellulaire utilisé.

3.4 Vérification de la séparation des protéines cytoplasmiques-mitochondriales et des protéines cytoplasmiques-nucléaires.

Afin d'assurer une bonne qualité des protéines utilisées pour l'obtention des résultats, nous avons vérifié la séparation des protéines à l'aide d'anticorps spécifiques aux compartiments cellulaires où nos protéines d'intérêt se retrouvent. Nous avons utilisé l'anti-TH (retrouvé dans le cytoplasme de la cellule) et l'anti-VDAC (protéine du canal retrouvé exclusivement dans la membrane externe de la mitochondrie). À la suite des révélations des protéines d'intérêt, nous avons décapé les membranes et de nouvelles révélations ont été faites avec les anticorps spécifiques à chaque compartiment cellulaire. Les résultats sont présents à la figure 3.3.

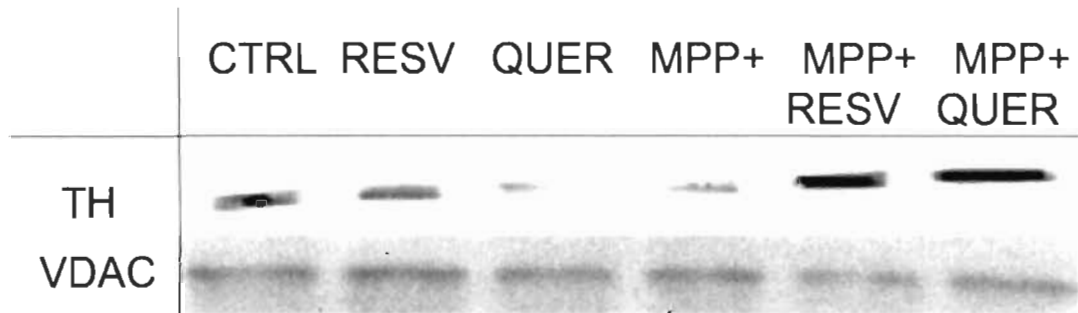


FIGURE 3.3 : Résultats de la bonne séparation des protéines cytoplasmiques et mitochondriales.

Dans le cas de l'extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaire, nous avons pu procéder au même type de contrôle de qualité. Nous avons utilisé l'anti-TH (retrouvé dans le cytoplasme de la cellule) et l'anti-HDAC1 (une histone désacétylase retrouvé dans le noyau). À la suite des révélations des protéines d'intérêts, nous avons décapé les membranes et de nouvelles révélations ont été faites avec les anticorps spécifiques à chaque compartiment cellulaire. Les résultats sont présents à la figure 3.4.

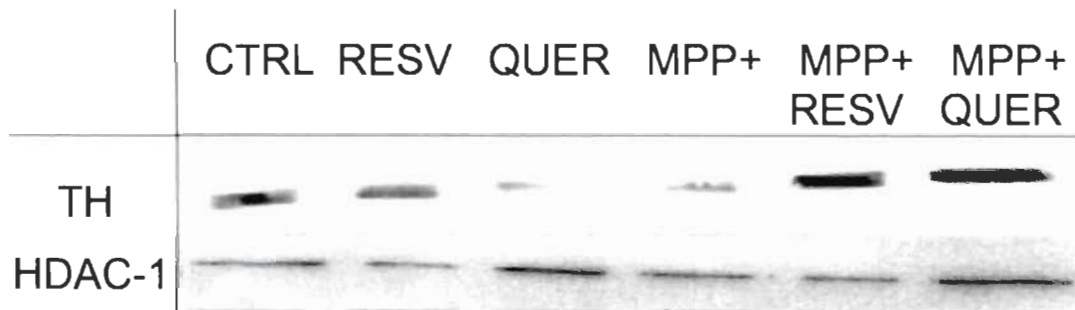


FIGURE 3.4 : Résultats de la bonne séparation des protéines cytoplasmiques et nucléaires.

CHAPITRE 4

ARTICLE

4.1 Ma contribution au travail de recherche ainsi que celle des coauteurs de l'article.

Durant mes études de maîtrise, j'ai fait les recherches, les manipulations et les mises au point du volet apoptose du resvératrol et de la quercétine présenté dans l'article : « **Protective effects of resveratrol and quercetin against apoptotic death in dopaminergic neurons** ». Cet article a été soumis dans la revue « Molecular and Cellular Neurobiology ».

Je suis responsable des résultats décrits dans presque toutes les figures, sauf la figure 4A et 4B qui sont l'œuvre du travail d'un stagiaire d'été sous ma supervision : Patrik Quessy.

4.2 Résumé de l'article en français.

Dans la maladie de Parkinson, le stress oxydant participe à la mort apoptotique des neurones dopaminergiques. Le pouvoir antioxydant des polyphénols, le resvératrol et la quercétine, est largement démontré par notre laboratoire et par d'autres. Le but de notre étude est d'évaluer l'effet du resvératrol et de la quercétine sur la cascade apoptotique induite par l'utilisation du MPP⁺, une toxine oxydante responsable de la mort sélective des neurones dopaminergiques. Suite à un pré-traitement de 3 heures avec le resvératrol ou la quercétine, nos résultats démontrent une diminution significative de la mort apoptotique induite par le MPP⁺. Le resvératrol et la quercétine réduisent aussi l'expression de Bax et augmente l'expression de Bcl-2. Nos résultats présentent un fort relâchement du CytC et d'AIF en présence du MPP⁺, et un revirement de situation lorsque les cellules subissent un pré-traitement avec les deux

polyphénols. Nous concluons que le resvératrol et la quercétine permettent de diminuer l'apoptose induite par le MPP⁺ en modulant des composants précis de la cascade apoptotique. Un traitement avec des polyphénols pourrait servir de traitement préventif pour la maladie de Parkinson ou même de traitement combiné aux traitements actuels.

4.3 Protective effects of resveratrol and quercetin against apoptotic death in dopaminergic neurons

Julie Bournival¹, Patrik Quessy¹ and Maria-Grazia Martinoli^{1,2*}

¹Department of Biochemistry and Neuroscience Research Group, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, G9A 5H7, Canada

²Neuroscience Research Center, Centre de recherche de l'Université Laval, Ste-Foy, Québec, G1V 4G2, Canada

** Corresponding author:*

Maria-Grazia Martinoli, Ph.D.

Department of Biochemistry

Université du Québec à Trois-Rivières

Trois-Rivières, QC, Canada G9A 5H7

Tel. 819-376-5011 ext. 3994

Fax: 819-376-5241

E-mail: martinol@uqtr.ca

Running title: Natural polyphenols protect dopaminergic neurons from apoptosis.

SUMMARY

Reactive oxygen species produced by oxidative stress may participate in the apoptotic death of dopamine neurons distinctive of Parkinson's disease. Resveratrol, a red wine extract, and quercetin, found mainly in green tea, are two natural polyphenols, presenting antioxidant properties in a variety of cellular paradigms. The aim of this study was to evaluate the effect of resveratrol and quercetin on the apoptotic cascade induced by the administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺), a Parkinsonian toxin, provoking the selective degeneration of dopaminergic neurons. Our results show that a pre-treatment of 3h with resveratrol or quercetin before MPP⁺ administration, could greatly reduce apoptotic neuronal PC12 death induced by MPP⁺. We also demonstrated that resveratrol or quercetin modulates mRNA levels and protein expression of Bax, a pro-apoptotic gene, and Bcl-2, an anti-apoptotic gene. We then evaluated the release of cytochrome c and the nuclear translocation of the apoptosis inducing factor, AIF. Altogether, our results indicate that resveratrol and quercetin diminish apoptotic neuronal cell death by acting on the expression of pro- and anti-apoptotic genes. These findings support the role of these natural polyphenols in preventive and/or complementary therapies for several human neurodegenerative diseases caused by oxidative stress and apoptosis.

Keywords: apoptosis, resveratrol, quercetin, neuroprotection, oxidative stress.

INTRODUCTION

The etiology of Parkinson's disease (PD) is not completely understood and many factors are speculated to operate in the mechanism of cell death of nigrostriatal dopaminergic (DAergic) neurons distinctive of PD. Among them, oxidative stress, resulting in an overproduction of toxic free radicals, might induce apoptotic cell death of DAergic neurons (Mochizuki et al., 1996; Danielson and Andersen, 2008).

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) has been widely used as a DAergic neurotoxin because it causes severe parkinsonism-like symptoms in humans as well as in monkeys and mice (Langston and Irwin, 1986; Kopin and Markey, 1988; Heikkila et al., 1989; Calon et al., 2001). MPTP crosses the brain-blood barrier and is converted into its toxic metabolite MPP⁺ in astrocytes by the enzyme monoamine oxidase B (Chiba et al., 1984). MPP⁺ is then selectively taken up by dopamine (DA) neurons via the high-affinity dopamine transporter (DAT) and is transported into mitochondria where it interferes with the respiration complex I (Javitch et al., 1985), resulting in the increased formation of superoxide anion (Akaneya et al., 1995; Jenner, 1998; Przedborski and Vila, 2003; Segura Aguilar and Kostrzewa, 2004) and caspase-3 activation (Du et al., 1997). Recently, it has been reported that MPP⁺ may act by other non-DAT dependent mechanisms (Mytilineou, 2001; Segura Aguilar and Kostrzewa, 2004).

Recent literature has disclosed that natural polyphenols such as resveratrol and quercetin, are naturally-occurring molecules that may exert neuroprotective effects similar to those of estrogens (Esposito et al., 2002; Heo and Lee, 2004). Interestingly, resveratrol interacts with estrogen receptors with 7,000 times less affinity than estrogens (Bowers et al., 2000) and modulates sirtuins, mainly SIRT-1, one of the proteins most involved in the lifespan extension of organisms in yeasts (Howitz et al., 2003). However, very recent data show that, in cerebellar neurons, the antiapoptotic actions of resveratrol are independent of SIRT-1 modulation and mainly sustained by its antioxidant properties (Dore,

2005; Alvira et al., 2007), possibly impacting regulatory systems, such as mitochondrial superoxide dismutase (Robb et al., 2008). Other data report that resveratrol could exert its beneficial influence through a combination of interactions with molecules that confer cellular stress resistance (Anekonda, 2006; Baur et al., 2006). Quercetin is a flavonoid compound possessing free radical scavenging properties and may protect from oxidative injury by its ability to modulate intracellular signals and promote cellular survival (Mercer et al., 2005). Like resveratrol, it has cardioprotective (Brookes et al., 2002), anticarcinogenic (Casagrande and Darbon, 2001; Lee et al., 2008), antioxidant (Heo and Lee, 2004), and antiapoptotic (Formica and Regelson, 1995) properties. Recent reports show that quercetin, when used at relative high doses, does not protect against H₂O₂-induced cell death in undifferentiated PC12 cells (Sasaki et al., 2007) and may induce apoptosis in primary neuronal cultures (Jakubowicz-Gil et al., 2008a). However, quercetin may present a protective effect in primary neurons against amyloid beta-peptide associated with neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD) (Ansari et al., 2008).

Recently a burden of literature reports a variety of protective roles for natural polyphenols and in particular for resveratrol (Dore, 2005; Anekonda, 2006; Baur et al., 2006; Ansari et al., 2008). However none of them, to date, addressed the specific role of resveratrol or quercetin on specific cellular parameters of apoptosis in DAergic neurons.

The aim of our present study was to examine in details the effect of resveratrol and quercetin on MPP⁺-induced apoptotic death. Our results show that both resveratrol and quercetin could reduce apoptotic neuronal PC12 death by acting on pro-apoptotic and anti-apoptotic genes, as well as on the release of cytochrome *c* and the modulation apoptosis inducing factor (AIF) nuclear translocation. Overall, our findings clearly demonstrate that resveratrol and quercetin are efficient protective molecules against the apoptotic cascade induced by oxidative stress and may serve in complementary and/or preventive therapies of neurodegenerative diseases.

METHODS

Drugs and chemicals

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

Cell Culture and Treatments

Rat PC12 cells were obtained from ATCC (Rockville, MD) and were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % heat-inactivated horse serum (HS) and 5 % heat-inactivated foetal bovine serum (FBS). PC12 cells neuronal differentiation was induced using nerve growth factor-7S (NGF, 50 ng/mL) in RPMI 1640 supplemented with 1 % FBS for 9 days, as already described (Gelinas and Martinoli, 2002). They were fed fresh medium every 2 days and maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂. To observe the effect of resveratrol or quercetin on MPP⁺-induced neuronal apoptosis, cells were preincubated with 0.1 µM resveratrol or quercetin for 3 h, then MPP⁺ 500 µM was added to the medium for 24 h. The concentrations of MPP⁺, resveratrol or quercetin, used in these experiments were determined by dose-response curves and kinetic studies (data not shown). Phenol red free medium and charcoal stripped serum were used in all experiences.

Apoptosis detection

Apoptotic neuronal cells were detected by both TUNEL (Roche Diagnostics Laval, Québec, Canada) assay as well as activated caspase-3 immunofluorescence. Neuronal PC12 cells were grown and treated on collagen coated circular glass coverslips in 24 wells (Fischer Scientific, Ottawa, Ont. Canada). Then, NGF-differentiated PC12 cells were fixed for 1 h in 4 % paraformaldehyde at 4°C, washed and further incubated in a blocking and permeabilizing solution (FSG buffer containing 1 % BSA, 0.18 % fish skin gelatine, 0.1 % Triton-X and 0.02 % sodium azide) for 1 h at room temperature (RT). The cells were incubated with the TUNEL reaction mixture for 60 min at 37°C, followed by labelling with an anti-cleaved caspase-3 antibody (New England Biolabs, Pickering, Ont. Canada) diluted 1:500, for additional 2 h at RT.

Coverslips were then transferred to a Cy3-conjugated secondary antibody (Medicorp, Montreal, Quebec, Canada) diluted 1:1,000 overnight at 4°C. Cells were then rinsed with phosphate buffered saline (PBS), nuclei were counterstained with 5 µg/ml of Hoechst 33342 for 10 min at 37°C, and finally mounted with a Molecular Probes ProLong Antifade kit (Invitrogen, Burlington, Ont. Canada). Images were acquired with a Leitz inverted microscope with a high-pressure mercury burner and necessary filter cubes. Neuronal cells were considered to be apoptotic when they were positive for cleaved caspase-3 and their nuclei were stained with TUNEL. We counted the number of apoptotic neuronal cells among 300 randomly chosen neuronal cells observed on 10 different optic fields, from 3 slides per group, by using NIS Elements 2.2 (Nikon, Mississauga, Ontario, Canada).

DNA fragmentation was also assessed using the ssDNA Apoptosis ELISA kit (Chemicon International, Temecula, CA) according to the manufacturer's instructions. This procedure is based on the selective denaturation of DNA by formamide in apoptotic cells but not in necrotic cells or in cells with DNA damage in the absence of apoptosis. The detection of denatured DNA was performed with a monoclonal antibody to single-stranded DNA (ssDNA). The staining of ssDNA in early apoptotic cells was accomplished with a mixture of antibody and peroxidase-labelled secondary antibody. Then, the reaction was stopped and ssDNA fragmentation was quantified by measuring absorbance at a wavelength of 405 nm on a microplate reader (Thermolab System, Franklin, MA). The amount of ssDNA was calculated with reference to control conditions. The absorbance of positive and negative control was also performed as quality control of ELISA test.

RT-PCR

Cells cultured on 6-well plates (Fischer Scientific, Ottawa, Ontario, Canada) were used for RT-PCR and immunoblotting experiments. Total RNA was extracted with Sigma's GenElute Mammalian Total RNA extraction kit. RNA was spectrophotometrically assayed for each condition, and then 1 µg of total RNA was reverse transcribed with 25 U of M-MULV reverse transcriptase, 1.5 µM

dNTP, and 10 μ M of random hexamers. The differential PCR amplification of each targeted mRNA and ribosomal 18s subunit (internal control) was amplified by 4 μ l of the cDNA reaction mixture, 10 μ l of HotMasterMix, and 0.2 μ M of each forward and reverse primer, in a total volume of 25 μ l. Primers for Bax (5'-TGC AGA GGA TGA TTG CTG AC-3' and 5'-GGA GGA AGT CCA GTG TCC AG -3') (Ando et al., 2005), Bcl-2 (5'-CTC GTC GCT ACC GTC GTG ACT TCG-3' and 5'-CAG ATG CCG GTT CAG GTA CTC AGT C-3') (Charalampopoulos et al., 2004) and ribosomal 18s subunit (5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3' and 5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3') (Schmittgen and Zakrajsek, 2000) were synthesized at Sigma Genosys. The expected amplicons were 208 bp, 242 bp and 150 bp, respectively. The standardized amplification protocol consisted of initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 30 sequential cycles at 94°C for 1 min, at 50 or 60°C for 1 min and at 70°C for 1.5 min. Amplification was carried out in a Bio-Rad iCycler system (Bio-Rad, Mississauga, Ont. Canada). To ensure that quantification was achieved in an exponential phase, a range of target and standard amounts were amplified over a range of cycles. The final number of cycles was chosen as the time for which the amplified products were still accumulating in a logarithmic fashion; i.e., the system was in the exponential phase, as described previously (Rousseau et al., 2002). Ten microliters of the PCR products were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gel in 1X TAE running buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) and stained with SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen). Images were acquired with the AlphaEase FC imaging system and analyzed with the AlphaEase FC program (AlphaInnotech, San Leandro, CA). Every analysis was correlated with the amplicon of ribosomal 18s subunit as internal amplification controls.

Electrophoresis and Immunoblot analysis

Total, nuclear or cytosolic proteins were extracted with a Nuclear Extraction Kit or with a Mitochondrial Fractionation Kit (Activemotif, Brockville, Ont., Canada), respectively. The protein concentration was determined by using the BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA). Equal amounts of

protein were loaded onto a 12 % SDS-polyacrylamide gel. After electrophoretic separation, the polyacrylamide gels were transferred onto nitrocellulose membranes. The blots were blocked for 1 h at room temperature in 5 % non-fat powdered milk. Dilutions of primary anti-Bax (1:200, Cedarlane, Burlington, Ont. Canada), anti-Bcl-2 (1:200, SantaCruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), anti-cytochrome *c* (1:1,000, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), anti-AIF (1:200, SantaCruz Biotechnology Inc.) anti-histone deacetylase 1 (HDAC-1) (1:250, SantaCruz Biotechnology Inc.), anti- voltage-dependent anion channel (VDAC) (1:1000) and anti-tyrosine hydroxylase (TH) (1:2000) were made in TBS-T with 0.5 g BSA and 25 mg sodium azide. Blots were washed and then incubated with POD-conjugated secondary antibody (1:10,000) for 2 h at room temperature and finally developed with an enhanced chemiluminescence substrate solution (Haan and Behrmann, 2007). Immunoblots were also labeled with TH for the cytosolic fraction, with HDAC1 for the nuclear fraction and with VDAC for the mitochondrial fraction, as control for each cellular fraction.

Statistical Analysis

Significant differences between groups were determined by analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's post hoc and the Student-Newman-Keuls analysis in the GraphPad Instat program, version 3.06 for Windows (San Diego, CA; www.graphpad.com). Data are expressed as the means \pm SEM from three independent experiments. Asterisks indicate statistical differences between treatment and control conditions, and circles show statistical differences between treatment and MPP⁺ conditions.

RESULTS

Resveratrol and quercetin reduce MPP⁺ - induced apoptotic death.

To determine whether resveratrol or quercetin may protect neuronal DA cells from apoptosis, we combined TUNEL assay and immunofluorescence with an antibody to activated caspase-3 (Fig.1A). Immunofluorescence clearly reveals the presence of numerous TUNEL (green) and caspase-3 positive cells (red) when MPP⁺ was administered alone (Fig. 1A, MPP⁺). Total nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). A pre-treatment of 3 h with resveratrol or quercetin could reduce the presence of apoptotic nuclei in neuronal PC12 cells, as revealed in figure 1A (MPP⁺/RESV or MPP⁺/QUER, respectively). The number of apoptotic cells was also determined by counting apoptotic cells among 300 neuronal cells on three slides per group, as described in Materials and Methods (Fig.1B). Resveratrol or quercetin administered alone did not significantly induce changes in the number of apoptotic cells, while the administration of MPP⁺ greatly increased their number to more than 3 times the control value (Fig.1B). We also observed a remarkable reduction in the number of apoptotic cells when resveratrol or quercetin were given prior to MPP⁺ (Fig.1B), thus sustaining an anti-apoptotic effect of these two polyphenols. In addition, we measured ssDNA fragmentation (Fig. 1C), a marker of late apoptosis. Neuronal cells treated with MPP⁺ showed a 40% increase in DNA fragmentation in comparison with control cells. This increase was strongly prevented by a pre-treatment with resveratrol and quercetin (Fig. 1C).

Resveratrol and quercetin change MPP⁺- induced Bax and Bcl-2 mRNA levels.

To further study the anti-apoptotic effect of resveratrol and quercetin, we analyzed whether these two polyphenols may modulate the gene expression of a pro-apoptotic gene, Bax, and of an anti-apoptotic gene, Bcl-2, induced by the administration of MPP⁺ (Fig. 2A and 2B, respectively). Our results show that

Bax mRNA levels are not modulated by administration of resveratrol or quercetin alone (Fig. 2A). On the other hand, a treatment of neuronal PC12 with MPP⁺ clearly increases Bax mRNA levels. More importantly, we noted a significant decrease after administration of MPP⁺ + resveratrol or + quercetin (Fig. 2A). Figure 2B shows no significant changes of Bcl-2 mRNA levels after MPP⁺ treatment, while treatments with MPP⁺ + resveratrol or + quercetin clearly induce the highest Bcl-2 mRNA levels, suggesting these two polyphenols elicit Bcl-2 mRNA levels to limit apoptosis induced by MPP⁺ administration in neuronal PC12 cells.

Resveratrol and quercetin modulate Bax and Bcl-2 protein expression.

To investigate the effects of MPP⁺, resveratrol or quercetin on Bax and Bcl-2 protein levels, western blotting was performed in neuronal PC12 cells treated with MPP⁺ with or without resveratrol or quercetin. Our results show that the administration of resveratrol or quercetin alone did not modulate the ratio Bax to Bcl-2 (Fig. 3). The ratio of pro-apoptotic Bax to anti-apoptotic Bcl-2 has been reported to be correlated to apoptosis (Wu et al., 2007a). Then, the administration of MPP⁺ alone significantly increased Bax/Bcl-2 ratio, indicating that the MPP⁺-induced apoptosis in PC12 is possibly mediated by the mitochondrial pathway. The MPP⁺ -induced increase of Bax/Bcl-2 ratio was attenuated in cells pretreated with resveratrol and quercetin (Fig. 3).

Resveratrol and quercetin modulate AIF nuclear translocation and the release of cytochrome c.

AIF is an apoptotic factor released by the mitochondrion during early events of apoptosis. It is then transported to the nucleus where it provokes DNA fragmentation (Smith et al., 2008). We investigated the translocation of AIF from the mitochondria to the nucleus during apoptosis induced by MPP⁺ (Fig. 4). When MPP⁺ was administered alone, we observed a significant rise of AIF in the cytosolic and nuclear fraction at 16 h (Fig. 4A). Six hours later, at 22 h, a maximal increase of AIF in the nuclear fraction was apparent (Fig. 4A). Thus, we analyzed whether resveratrol or quercetin might modulate AIF translocation

at 22 hours of MPP⁺ administration (Fig. 4B). Indeed, when resveratrol or quercetin were administered prior to MPP⁺, we detected a decrease of AIF in cytosolic and in nuclear fraction compared to the MPP⁺ condition at 22 h (Fig. 4B). To elucidate the effect of resveratrol and quercetin on the mitochondrial role in neuronal PC12 cells undergoing MPP⁺-induced apoptosis, the release of cytochrome *c* from the mitochondria into the cytosol was determined by Western blot (Fig. 5). Cytochrome *c* is a mitochondrial protein released into the cytoplasm upon apoptotic stimulation. This event further triggers caspase-3 activation and eventually leads to apoptosis. The increase of cytochrome *c* levels in the cytosolic fraction of cells treated with MPP⁺ for 24h was attenuated by a pre-treatment with resveratrol or quercetin prior to MPP⁺ addition (Fig. 5). Resveratrol alone does not modulate cytochrome *c* release significantly while quercetin alone does. An anti-VDAC antibody was also used to control for purity of cytosolic fraction since VDAC is exclusively present in mitochondrial fraction (data not shown).

DISCUSSION

Previous studies indicate that DAergic neurons degenerate by apoptosis in the substantia nigra *pars compacta* (SNpc) of PD patients (Hirsch et al., 1999). MPTP is the best characterized neurotoxin responsible for the sudden onset of parkinsonism-like symptoms in humans as well as in monkeys and mice (Langston and Irwin, 1986; Kopin and Markey, 1988; Heikkila et al., 1989; Calon et al., 2001). MPTP administration to C57BL mice leads to a decline in striatal DA and TH levels in the SNpc (Jakowec et al., 2004; Blanchet et al., 2008) as well as the death of DA neurons (Dauer and Przedborski, 2003). The active metabolite of MPTP, MPP⁺, a polar molecule, may enter into mitochondria and bind to complex I, which interrupts the transfer of electrons from complex I to ubiquinone. This perturbation enhances the production of reactive oxygen species (ROS) and decreases the synthesis of ATP and leads to apoptosis (Przedborski et al., 2000; Dauer and Przedborski, 2003). *In vitro*, MPP⁺ administration induces a decline of TH in PC12 cells (Chalimoniuk et al., 2006) and in other cellular models (Dalia et al., 1996).

In this study, neuronal PC12 cells treated with MPP⁺ were used as a cellular model of PD, as already well characterized (Greene and Tischler, 1976; Ryu et al., 2005). PC12 cells stimulated with NGF secrete high DA levels and express TH, DAT, neurofilaments as well as estrogen receptor-alpha (ER α) and -beta (ER β) (Lee et al., 1982; Kadota et al., 1996; Nilsen et al., 1998; Gelinis and Martinoli, 2002; Chiasson et al., 2006). Our previous studies demonstrated the powerful neuroprotective activity of resveratrol and quercetin in dopaminergic neurons, *in vitro* and *in vivo* (Gelinis and Martinoli, 2002; Gagne et al., 2003; Blanchet et al., 2008; Bureau et al., 2008). These present results disclose that the administration of resveratrol or quercetin, prior to the potent oxidant toxin MPP⁺ reduces the number of apoptotic neuronal PC12 cells. Furthermore, we show that resveratrol and quercetin when used at relative low doses (10^{-7} M) could reduce apoptosis by decreasing the Bax/Bcl-2 ratio, inhibiting AIF nuclear

translocation and cytosolic cytochrome *c* release, thus supporting a neuroprotective role for these two natural polyphenols mediated through a complex intracellular trafficking.

During the last decade, considerable evidence has supported the neuroprotective effects of estrogens (Behl, 2002; Gelinas and Martinoli, 2002; Gagne et al., 2003; Gelinas et al., 2004). Several properties of estrogens contribute to their neuroprotective effects, including antioxidant (Moosmann and Behl, 1999; Gelinas and Martinoli, 2002; Gelinas et al., 2004; Wang et al., 2006), antiapoptotic (Sawada et al., 2000a; Alexaki et al., 2004; Jung et al., 2008) and anti-inflammatory actions (Morale et al., 2006; Vegeto et al., 2008). Estrogens have been found to protect PC12 cells against apoptosis induced by CoCl_2 (Jung et al., 2008) and others toxins (Piga et al., 2007). Nowadays, it is also recognized that estrogen replacement therapy (ERT) in postmenopausal women reduces the risk of neurodegenerative diseases, such as PD (Currie et al., 2004). Yet, very recent clinical studies have raised growing concern about the side effects of ERT (Purdie, 2000; Rachon and Teede, 2008). On the other hand, natural polyphenols with no specific estrogenic side-effects, possess free radical scavenging properties and thus, may exert antiapoptotic effects in cell culture as well as *in vivo* (Linford and Dorsa, 2002; Lo et al., 2007; Baluchnejadmojarad et al., 2008). Resveratrol, a polyphenol primarily contained in red grapes and red wine, greatly decreases MPP^+ -induced cellular death, but does not modulate $\text{ER-}\alpha$ and $\text{ER-}\beta$ or DAT, supporting its role as a powerful antioxidant (Gelinas and Martinoli, 2002; Dore, 2005; Alvira et al., 2007; Robb et al., 2008). Indeed, the neuroprotective potential of certain natural polyphenols is based on their antioxidant action and is independent of their estrogenic properties (Behl et al., 1997; Behl and Manthey, 2000). Resveratrol, is known to protect neuronal cells against MPP^+ -induced oxidative stress and cellular death (Gelinas and Martinoli, 2002; Okawara et al., 2007). Its beneficial effects against AD pathogenesis have also been reported (Anekonda, 2006). Moreover, some resveratrol oligomers may prevent $\text{A}\beta$ -induced neurotoxicity by a significant suppression of DNA fragmentation and caspase-3 activation (Jang

et al., 2007). Resveratrol pretreatment also leads to a decrease in cleavage of the nuclear enzyme poly-(ADP-ribose)-polymerase (Lee et al., 2007), thus restraining DNA fragmentation. Quercetin is a flavonoid mostly contained in green tea, onions, and apples (Ross and Kasum, 2002). On the other hand, quercetin binds to both α -ER and β -ER with low affinity (Kuiper et al., 1998) and is a potent anti-oxidant (Moosmann and Behl, 1999). Within the flavonoid family, quercetin is the most potent scavenger of ROS, including $O_2^{\bullet-}$ (Hanasaki et al., 1994; Cushnie and Lamb, 2005). This natural phenolic compound potently inhibits melanoma cell proliferation by inhibiting PI 3-kinase and the protein kinase CDK2 (Casagrande and Darbon, 2001). It should be noted, however, that quercetin also shows paradoxical actions in neuronal cells. Indeed, quercetin is reported to induce apoptosis in native PC 12 cells when used at 10-30 μ M (Sasaki et al. 2007), and to induce cell death in primary neuronal culture (Jakubowicz-Gil et al., 2008a; Jakubowicz-Gil et al., 2008b) when used at 3-45 mM concentration.

Our findings show that MPP^+ could induce apoptotic cell death as detected by TUNEL, activated caspase-3 and DNA fragmentation. These results are consistent with other in vitro studies on other cell types (Hartley et al., 1994; Itano and Nomura, 1995; Wu et al., 2007b) and further support a role for natural polyphenols in the apoptotic cascade induced by oxidative agents.

Bcl-2 is a key member of the anti-apoptotic Bcl-2 family and is a potent inhibitor of apoptotic cell death (Cory and Adams, 2002). Bcl-2 and Bcl-xL preserve mitochondrial integrity and prevent the subsequent release of apoptogenic molecules such as cytochrome *c* (Gollapudi et al., 2003). On the other hand, Bax is also a member of the Bcl-2 protein family. It accelerates the rate of apoptosis by a contribution to the permeabilization of the outer mitochondrial membrane, either by forming channels by themselves or by interacting with components of the outer mitochondrial membrane pore such as VDAC (Tsujimoto and Shimizu, 2000). In this study, we examined in details the modulation of the gene expression of Bcl-2 and Bax after treatments with MPP^+ . First, our data indicate that this neurotoxin does not act on the apoptotic gene

Bcl-2. On the other side, treatments with MPP⁺ stimulated an increase in Bax mRNA levels. Then, when resveratrol or quercetin were administered 3 h before MPP⁺, we observed a decrease in Bax mRNA levels and a strong induction of Bcl-2 mRNA expression, sustaining 1) a direct action of these two polyphenols on Bax gene expression and 2) an anti-apoptotic role for resveratrol and quercetin in neuronal PC12 cells. At the protein level, rise in the ratio of Bax to Bcl-2 indicates cellular improvement to apoptosis (Korsmeyer et al., 1993). Our data reveal that Bax/Bcl-2 protein ratio is increased following a treatment with MPP⁺, but it decreases with the administration of resveratrol or quercetin prior to MPP⁺. These results suggest that resveratrol or quercetin can indeed diminish MPP⁺-induced apoptotic cell death.

Moreover, the disruption of mitochondrial transmembrane potential is a key event which leads to the release of cytochrome *c* and caspase-3 activation (Perkins et al., 2000). The interaction of cytochrome *c* with Apaf-1 protein results in the recruitment of procaspase-9, following the activation of caspase-3, and subsequently contributes to apoptotic cell death (Smith et al., 2008). Then, the cellular redistribution of AIF can induce chromosomal DNA cleavage (Smith et al., 2008). In fact, its translocation from mitochondria to the nucleus leads to chromatin condensation and large-scale DNA fragmentation (Krantic et al., 2007). In addition, results from the *in vivo* MPTP rodent model have indicated the participation of AIF in DAergic cell death (Liou et al., 2005). Our present findings show that MPP⁺ induces an important release of cytochrome *c* and AIF translocation from mitochondria to the nucleus while resveratrol or quercetin can prevent these events, supporting a strong antiapoptotic potential for these two natural polyphenols.

Finally, even if recent literature report various protective roles for natural polyphenols and in particular for resveratrol, none of them, to date, addressed the specific role of resveratrol or quercetin on specific parameters of apoptosis. Indeed, altogether our results demonstrate that the MPP⁺-induced apoptosis in PC12 neuronal cells can be reverted by resveratrol or quercetin; as such they

may be regarded as powerful natural molecules for complementary neuroprotective therapy.

Acknowledgments

This work was funded by a Natural Sciences and Engineering Research Council (Canada) grant to MGM. JB is recipient of a studentship from Fonds de Recherche en Santé du Québec. We would like to thank Mrs. Fanny Longpré and Mr. Joshua Cloutier-Beaupré for their helpful technical assistance.

REFERENCES

Akaneya Y, Takahashi M, Hatanaka H (Involvement of free radicals in MPP+ neurotoxicity against rat dopaminergic neurons in culture. *Neuroscience letters* 193:53-56.1995).

Alexaki VI, Charalampopoulos I, Kampa M, Vassalou H, Theodoropoulos P, Stathopoulos EN, Hatzoglou A, Gravanis A, Castanas E (Estrogen exerts neuroprotective effects via membrane estrogen receptors and rapid Akt/NOS activation. *Faseb J* 18:1594-1596.2004).

Alvira D, Yeste-Velasco M, Folch J, Verdaguer E, Canudas AM, Pallas M, Camins A (Comparative analysis of the effects of resveratrol in two apoptotic models: inhibition of complex I and potassium deprivation in cerebellar neurons. *Neuroscience* 147:746-756.2007).

Ando A, Yamazaki Y, Kaneko S, Miyake M, Nambu R, Taomoto M, Unezaki S, Okuda-Ashitaka E, Okumura T, Ito S, Matsumura M (Cytoprotection by nipradilol, an anti-glaucomatous agent, via down-regulation of apoptosis related gene expression and activation of NF-kappaB. *Experimental eye research* 80:501-507.2005).

Anekonda TS (Resveratrol--a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev* 52:316-326.2006).

Ansari MA, Abdul HM, Joshi G, Opii WO, Butterfield DA (Protective effect of quercetin in primary neurons against Abeta(1-42): relevance to Alzheimer's disease. *The Journal of nutritional biochemistry*.2008).

Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Nadoushan MR, Bagheri M (Neuroprotective effect of genistein in 6-hydroxydopamine Hemi-parkinsonian rat model. *Phytother Res*.2008).

Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA (Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444:337-342.2006).

Behl C (Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nature reviews* 3:433-442.2002).

Behl C, Manthey D (Neuroprotective activities of estrogen: an update. *Journal of neurocytology* 29:351-358.2000).

Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F (Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Molecular pharmacology* 51:535-541.1997).

Blanchet J, Longpre F, Bureau G, Morissette M, Dipaolo T, Bronchti G, Martinoli MG (Resveratrol, a red wine polyphenol, protects dopaminergic neurons in MPTP-treated mice. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 32:1243-1250.2008).

Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, Klinge CM (Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 141:3657-3667.2000).

Brookes PS, Digerness SB, Parks DA, Darley-Usmar V (Mitochondrial function in response to cardiac ischemia-reperfusion after oral treatment with quercetin. *Free radical biology & medicine* 32:1220-1228.2002).

Bureau G, Longpre F, Martinoli MG (Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. *Journal of neuroscience research* 86:403-410.2008).

Calon F, Lavertu N, Lemieux AM, Morissette M, Goulet M, Grondin R, Blanchet PJ, Bedard PJ, Di Paolo T (Effect of MPTP-induced denervation on basal ganglia GABA(B) receptors: correlation with dopamine concentrations and dopamine transporter. *Synapse* 40:225-234.2001).

Casagrande F, Darbon JM (Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochemical pharmacology* 61:1205-1215.2001).

Chalimoniuk M, Snoek GT, Adamczyk A, Malecki A, Strosznajder JB (Phosphatidylinositol transfer protein expression altered by aging and Parkinson disease. *Cell Mol Neurobiol* 26:1153-1166.2006).

Charalampopoulos I, Tsatsanis C, Dermitzaki E, Alexaki VI, Castanas E, Margioris AN, Gravanis A (Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via antiapoptotic Bcl-2 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:8209-8214.2004).

Chiasson K, Lahaie-Collins V, Bournival J, Delapierre B, Gelinat S, Martinoli MG (Oxidative stress and 17-alpha- and 17-beta-estradiol modulate neurofilaments differently. *J Mol Neurosci* 30:297-310.2006).

Chiba K, Trevor A, Castagnoli N, Jr. (Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochemical and biophysical research communications* 120:574-578.1984).

Cory S, Adams JM (The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews* 2:647-656.2002).

Currie LJ, Harrison MB, Trugman JM, Bennett JP, Wooten GF (Postmenopausal estrogen use affects risk for Parkinson disease. *Archives of neurology* 61:886-888.2004).

Cushnie TP, Lamb AJ (Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents* 26:343-356.2005).

Dalia A, Neff NH, Hadjiconstantinou M (Tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase in mesencephalic cultures after MPP+: the consequences of treatment with GM1 ganglioside. *Brain Res* 742:260-264.1996).

Danielson SR, Andersen JK (Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. *Free radical biology & medicine* 44:1787-1794.2008).

Dauer W, Przedborski S (Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909.2003).

Dore S (Unique properties of polyphenol stilbenes in the brain: more than direct antioxidant actions; gene/protein regulatory activity. *Neuro-Signals* 14:61-70.2005).

Du Y, Dodel RC, Bales KR, Jemmerson R, Hamilton-Byrd E, Paul SM (Involvement of a caspase-3-like cysteine protease in 1-methyl-4-phenylpyridinium-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Journal of neurochemistry* 69:1382-1388.1997).

Esposito E, Rotilio D, Di Matteo V, Di Giulio C, Cacchio M, Algeri S (A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiology of aging* 23:719-735.2002).

Formica JV, Regelson W (Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 33:1061-1080.1995).

Gagne B, Gelinas S, Bureau G, Lagace B, Ramassamy C, Chiasson K, Valastro B, Martinoli MG (Effects of estradiol, phytoestrogens, and Ginkgo biloba extracts against 1-methyl-4-phenyl-pyridine-induced oxidative stress. *Endocrine* 21:89-95.2003).

Gelinas S, Bureau G, Valastro B, Massicotte G, Cicchetti F, Chiasson K, Gagne B, Blanchet J, Martinoli MG (Alpha and beta estradiol protect neuronal but not native PC12 cells from paraquat-induced oxidative stress. *Neurotoxicity research* 6:141-148.2004).

Gelinas S, Martinoli MG (Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP+-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells. *Journal of neuroscience research* 70:90-96.2002).

Gollapudi S, McCormick MJ, Gupta S (Changes in mitochondrial membrane potential and mitochondrial mass occur independent of the activation of caspase-8 and caspase-3 during CD95-mediated apoptosis in peripheral blood T cells. *International journal of oncology* 22:597-600.2003).

Greene LA, Tischler AS (Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73:2424-2428.1976).

Haan C, Behrmann I (A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *Journal of immunological methods* 318:11-19.2007).

Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S (The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free radical biology & medicine* 16:845-850.1994).

Hartley A, Stone JM, Heron C, Cooper JM, Schapira AH (Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: relevance to Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 63:1987-1990.1994).

Heikkila RE, Sieber BA, Manzino L, Sonsalla PK (Some features of the nigrostriatal dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse. *Molecular and chemical neuropathology / sponsored by the International Society for Neurochemistry and the World Federation of Neurology and research groups on neurochemistry and cerebrospinal fluid* 10:171-183.1989).

Heo HJ, Lee CY (Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. *Journal of agricultural and food chemistry* 52:7514-7517.2004).

Hirsch EC, Hunot S, Faucheux B, Agid Y, Mizuno Y, Mochizuki H, Tatton WG, Tatton N, Olanow WC (Dopaminergic neurons degenerate by apoptosis in Parkinson's disease. *Mov Disord* 14:383-385.1999).

Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA (Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425:191-196.2003).

Itano Y, Nomura Y (1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion (MPP+) causes DNA fragmentation and increases the Bcl-2 expression in human neuroblastoma, SH-SY5Y cells, through different mechanisms. *Brain Res* 704:240-245.1995).

Jakowec MW, Nixon K, Hogg E, McNeill T, Petzinger GM (Tyrosine hydroxylase and dopamine transporter expression following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration of the mouse nigrostriatal pathway. *J Neurosci Res* 76:539-550.2004).

Jakubowicz-Gil J, Rzeski W, Zdzisinska B, Dobrowolski P, Gawron A (Cell death and neuronal arborization upon quercetin treatment in rat neurons. *Acta neurobiologiae experimentalis* 68:139-146.2008a).

Jakubowicz-Gil J, Rzeski W, Zdzisinska B, Piersiak T, Weiksza K, Glowniak K, Gawron A (Different sensitivity of neurons and neuroblastoma cells to quercetin treatment. *Acta neurobiologiae experimentalis* 68:463-476.2008b).

Jang MH, Piao XL, Kim HY, Cho EJ, Baek SH, Kwon SW, Park JH (Resveratrol oligomers from *Vitis amurensis* attenuate beta-amyloid-induced oxidative stress in PC12 cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* 30:1130-1134.2007).

Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH (Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82:2173-2177.1985).

Jenner P (Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord* 13 Suppl 1:24-34.1998).

Jung JY, Roh KH, Jeong YJ, Kim SH, Lee EJ, Kim MS, Oh WM, Oh HK, Kim WJ (Estradiol protects PC12 cells against CoCl₂-induced apoptosis. *Brain research bulletin* 76:579-585.2008).

Kadota T, Yamaai T, Saito Y, Akita Y, Kawashima S, Moroi K, Inagaki N, Kadota K (Expression of dopamine transporter at the tips of growing neurites of PC12 cells. *J Histochem Cytochem* 44:989-996.1996).

Kopin IJ, Markey SP (MPTP toxicity: implications for research in Parkinson's disease. *Annual review of neuroscience* 11:81-96.1988).

Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN (Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Seminars in cancer biology* 4:327-332.1993).

Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R (Apoptosis-inducing factor: a matter of neuron life and death. *Progress in neurobiology* 81:179-196.2007).

Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA (Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139:4252-4263.1998).

Langston JW, Irwin I (MPTP: current concepts and controversies. *Clinical neuropharmacology* 9:485-507.1986).

Lee KW, Kang NJ, Heo YS, Rogozin EA, Pugliese A, Hwang MK, Bowden GT, Bode AM, Lee HJ, Dong Z (Raf and MEK protein kinases are direct molecular targets for the chemopreventive effect of quercetin, a major flavonol in red wine. *Cancer research* 68:946-955.2008).

Lee MK, Kang SJ, Poncz M, Song KJ, Park KS (Resveratrol protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from apoptosis induced by dopamine. *Experimental & molecular medicine* 39:376-384.2007).

Lee V, Trojanowski JQ, Schlaepfer WW (Induction of neurofilament triplet proteins in PC12 cells by nerve growth factor. *Brain research* 238:169-180.1982).

Linford NJ, Dorsa DM (17beta-Estradiol and the phytoestrogen genistein attenuate neuronal apoptosis induced by the endoplasmic reticulum calcium-ATPase inhibitor thapsigargin. *Steroids* 67:1029-1040.2002).

Liou AK, Zhou Z, Pei W, Lim TM, Yin XM, Chen J (BimEL up-regulation potentiates AIF translocation and cell death in response to MPTP. *Faseb J* 19:1350-1352.2005).

Lo FH, Mak NK, Leung KN (Studies on the anti-tumor activities of the soy isoflavone daidzein on murine neuroblastoma cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 61:591-595.2007).

Mercer LD, Kelly BL, Horne MK, Beart PM (Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. *Biochemical pharmacology* 69:339-345.2005).

Mochizuki H, Goto K, Mori H, Mizuno Y (Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences* 137:120-123.1996).

Moosmann B, Behl C (The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:8867-8872.1999).

Morale MC, Serra PA, L'Episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, Testa N, Gennuso F, Giaquinta G, Rocchitta G, Desole MS, Miele E, Marchetti B (Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience* 138:869-878.2006).

Mytilineou (2001) Mechanism of MPTP neurotoxicity. *Mechanisms of Degeneration and Protection of the Dopaminergic System* Johnson City, TN: FP Graham Publ.

Nilsen J, Mor G, Naftolin F (Raloxifene induces neurite outgrowth in estrogen receptor positive PC12 cells. *Menopause (New York, NY)* 5:211-216.1998).

Okawara M, Katsuki H, Kurimoto E, Shibata H, Kume T, Akaike A (Resveratrol protects dopaminergic neurons in midbrain slice culture from multiple insults. *Biochem Pharmacol* 73:550-560.2007).

Perkins CL, Fang G, Kim CN, Bhalla KN (The role of Apaf-1, caspase-9, and bid proteins in etoposide- or paclitaxel-induced mitochondrial events during apoptosis. *Cancer research* 60:1645-1653.2000).

Piga R, Saito Y, Yoshida Y, Niki E (Cytotoxic effects of various stressors on PC12 cells: involvement of oxidative stress and effect of antioxidants. *Neurotoxicology* 28:67-75.2007).

Przedborski S, Jackson-Lewis V, Djaldetti R, Liberatore G, Vila M, Vukosavic S, Almer G (The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restorative neurology and neuroscience* 16:135-142.2000).

Przedborski S, Vila M (The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 991:189-198.2003).

Purdie DW (Consequences of long-term hormone replacement therapy. *British medical bulletin* 56:809-823.2000).

Rachon D, Teede H (Postmenopausal hormone therapy and the risk of venous thromboembolism. *Climacteric* 11:273-279.2008).

Robb EL, Page MM, Wiens BE, Stuart JA (Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD. *Biochemical and biophysical research communications* 367:406-412.2008).

Ross JA, Kasum CM (Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual review of nutrition* 22:19-34.2002).

Rousseau J, Cossette L, Grenier S, Martinoli MG (Modulation of prolactin expression by xenoestrogens. *General and comparative endocrinology* 126:175-182.2002).

Ryu EJ, Angelastro JM, Greene LA (Analysis of gene expression changes in a cellular model of Parkinson disease. *Neurobiology of disease* 18:54-74.2005).

Sasaki M, Nakamura H, Tsuchiya S, Horie S, Kashiwayanagi M, Saito T, Murayama T (Quercetin-induced PC12 cell death accompanied by caspase-mediated DNA fragmentation. *Biological & pharmaceutical bulletin* 30:682-686.2007).

Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Honda K, Nakanishi M, Akaike A, Shimohama S (Mechanisms of antiapoptotic effects of estrogens in nigral dopaminergic neurons. *Faseb J* 14:1202-1214.2000).

Schmittgen TD, Zakrajsek BA (Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of biochemical and biophysical methods* 46:69-81.2000).

Segura Aguilar J, Kostrzewa RM (Neurotoxins and neurotoxic species implicated in neurodegeneration. *Neurotoxicity research* 6:615-630.2004).

Smith DJ, Ng H, Kluck RM, Nagley P (The mitochondrial gateway to cell death. *IUBMB life* 60:383-389.2008).

Tsujimoto Y, Shimizu S (VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell death and differentiation* 7:1174-1181.2000).

Vegeto E, Benedusi V, Maggi A (Estrogen anti-inflammatory activity in brain: A therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. *Frontiers in neuroendocrinology*.2008).

Wang X, Dykens JA, Perez E, Liu R, Yang S, Covey DF, Simpkins JW (Neuroprotective effects of 17beta-estradiol and nonfeminizing estrogens against H₂O₂ toxicity in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Molecular pharmacology* 70:395-404.2006).

Wu Y, Shang Y, Sun S, Liang H, Liu R (Erythropoietin prevents PC12 cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis via the Akt/GSK-3beta/caspase-3 mediated signaling pathway. *Apoptosis* 12:1365-1375.2007a).

Wu Y, Shang Y, Sun SG, Liu RG, Yang WQ (Protective effect of erythropoietin against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurodegeneration in PC12 cells. *Neuroscience bulletin* 23:156-164.2007b).

FIGURE LEGENDS

Figure 1: A) Immunofluorescence detection of apoptotic neuronal PC12 cells. Blue: Total neuronal PC12 nuclei were counterstained with Hoechst 33342. Red: Anti-cleaved caspase-3 antibody. Green: TUNEL. Merged: Cells are considered apoptotic when positive for both TUNEL (green) and anti-cleaved caspase-3 antibody (red). They appear as light blue cells because of the third superposition of dark blue Hoechst 33342. Immunofluorescence clearly illustrates that there are less apoptotic PC12 cells (light blue) when cells are treated with resveratrol (RESV) or quercetin (QUER) prior to MPP⁺ addition. **B)** Histogram showing the number of apoptotic cells counted on triple-stained slides (merged) on a total of 100 nuclei, as described in Materials and Methods. Pre-treatment with resveratrol (RESV) or quercetin (QUER) strongly reduced the number of apoptotic neuronal PC12 cells. **C)** Histogram of DNA fragmentation in apoptotic cells detected with a monoclonal antibody to single-stranded DNA (ssDNA). Pre-treatment of MPP⁺ treated cells with resveratrol (RESV) or quercetin (QUER) shows a significant decrease in DNA fragmentation. $***p < 0.001$ compared with control (CTRL), $^{\circ}p < 0.01$ and $^{\circ\circ}p < 0.001$ compared with MPP⁺ as determined by ANOVA, followed by Dunnett's multiple-comparisons test.

Figure 2: A) Bax mRNA levels, as revealed by RT-PCR, are increased with MPP⁺ treatment. Treatment with resveratrol (RESV) or quercetin (QUER) prior to MPP⁺ administration detects a significant decrease of Bax mRNA expression. Bottom: RT-PCR bands of Bax mRNA and 18S as control. **B)** Bcl-2 mRNA levels, as revealed by RT-PCR. Treatment with resveratrol (RESV) or quercetin (QUER) prior to MPP⁺ administration detects a significant increase of Bcl-2 mRNA expression. Bottom: RT-PCR bands of Bcl-2 mRNA and 18S as control. $***p < 0.001$ compared with control (CTRL), $^{\circ}p < 0.05$ and $^{\circ\circ}p < 0.001$ compared with MPP⁺ as determined by ANOVA, followed by Dunnett's multiple-comparisons test.

Figure 3: Effect of resveratrol (RESV) or quercetin (QUER) on the Bax/Bcl-2 ratio in PC12 cells. The levels of Bax and Bcl-2 protein expression were analyzed and the Bax/Bcl-2 ratio was determined for each treatments. Resveratrol (RESV) or quercetin (QUER) alone did not modulate Bax/Bcl-2 ratio. MPP⁺ increased Bax/Bcl-2 ratio and the addition of resveratrol or quercetin strongly prevented this increase. Bottom: bands of Bax and Bcl-2 as revealed by Western blots. $**p < 0.01$ compared with control (CTRL), $^{\circ\circ}p < 0.01$ and $^{\circ\circ\circ}p < 0.001$ compared with MPP⁺ as determined by ANOVA, followed by Dunnett's multiple-comparisons test.

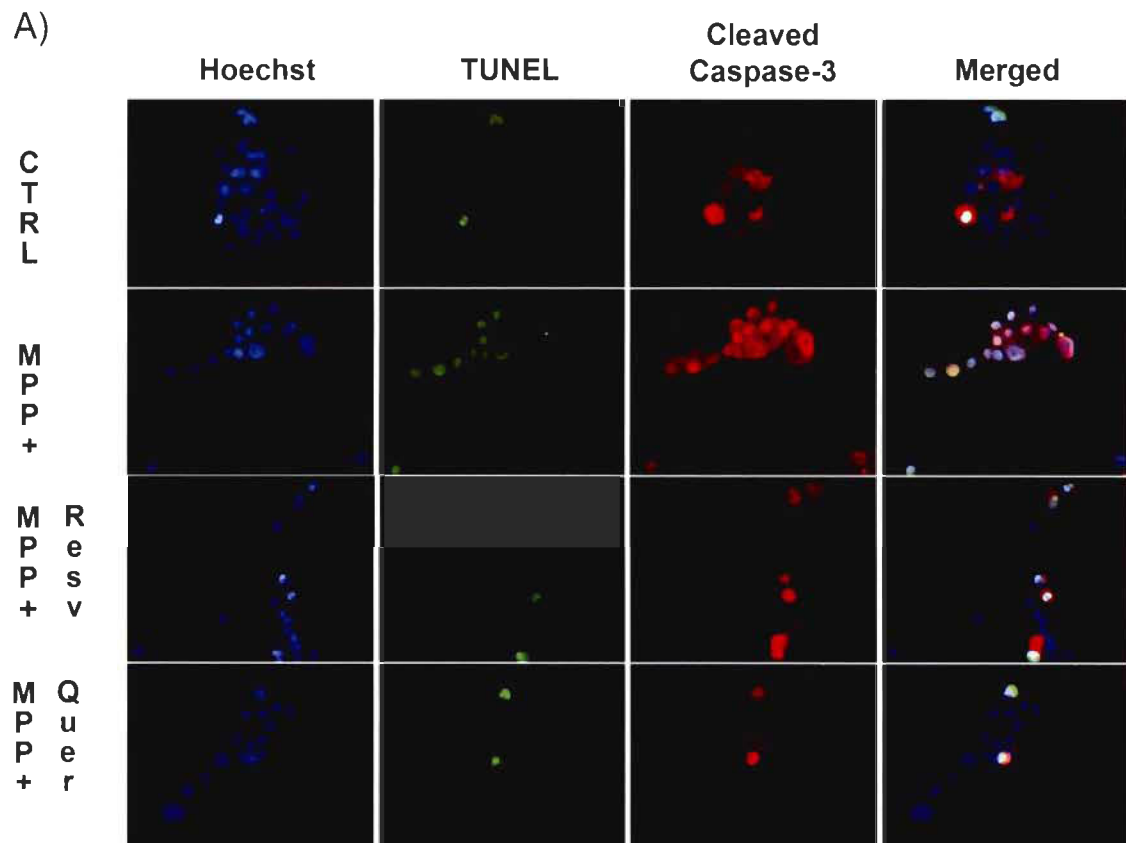
Figure 4: A) Histogram of kinetic studies showing AIF translocation from the cytoplasm to the nucleus during 24 h. AIF protein increases in the cytosolic and nuclear fraction at 22 h of treatment with MPP⁺. Black line indicates nuclear/cytoplasm ratio of AIF protein. $^{\circ\circ\circ}p < 0.001$ compared with CTRL (nuclear/cytoplasm ratio) as determined by ANOVA, followed by Dunnett's multiple-comparisons test. B) Histogram revealing total amounts of AIF protein levels in each cellular fraction after resveratrol (RESV), quercetin (QUER) and MPP⁺ treatments. Bands show total amounts of AIF protein levels in each cellular fraction. In each fraction, pretreatment with resveratrol (RESV) or quercetin (QUER) leads to a significant reduction of AIF protein expression. An anti-TH antibody was used as control for cytosolic fraction and an anti-HDAC antibody was used to control for nuclear fraction. $***p < 0.001$ and $**p < 0.01$ compared with control (CTRL), $^{\circ}p < 0.05$, $^{\circ\circ}p < 0.01$ and $^{\circ\circ\circ}p < 0.001$ compared with MPP⁺ as determined by ANOVA, followed by Dunnett's multiple-comparisons test.

Figure 5: Western blots analysis of cytosolic cytochrome c after each treatment. Resveratrol and quercetin did not modulate cytochrome c expression when used alone in neuronal PC12 cells. When resveratrol and quercetin were administered 3h prior to MPP⁺ treatment, a decrease of cytosolic cytochrome c protein expression was apparent. An anti-TH antibody was used as control for

cytosolic fraction. $***p < 0.001$ and $*p < 0.05$ compared with control (CTRL), ${}^{\circ\circ}p < 0.01$ and ${}^{\circ\circ\circ}p < 0.001$ compared with MPP+ as determined by ANOVA, followed by Dunnett's multiple-comparisons test.

Figure Lists

Figure 1:



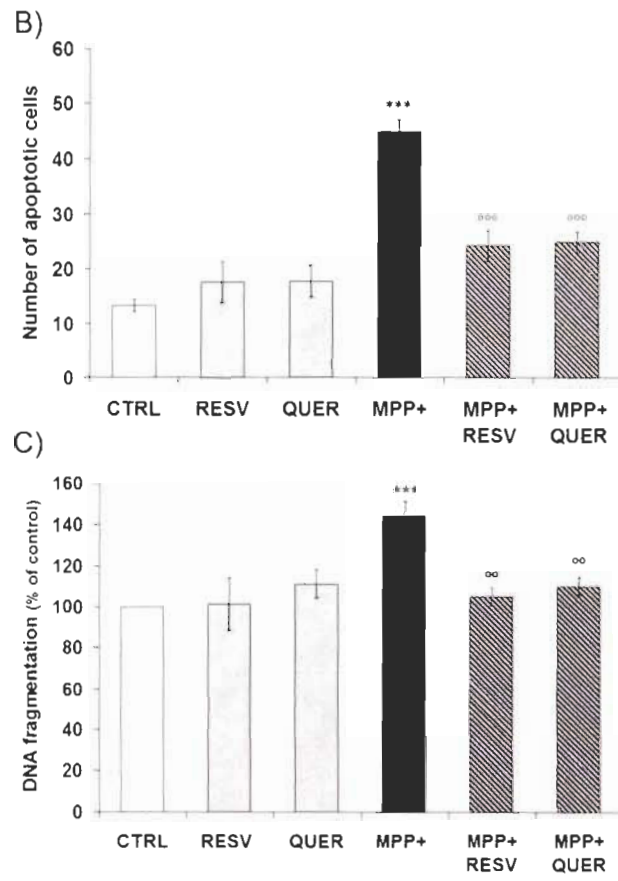


Figure 2:

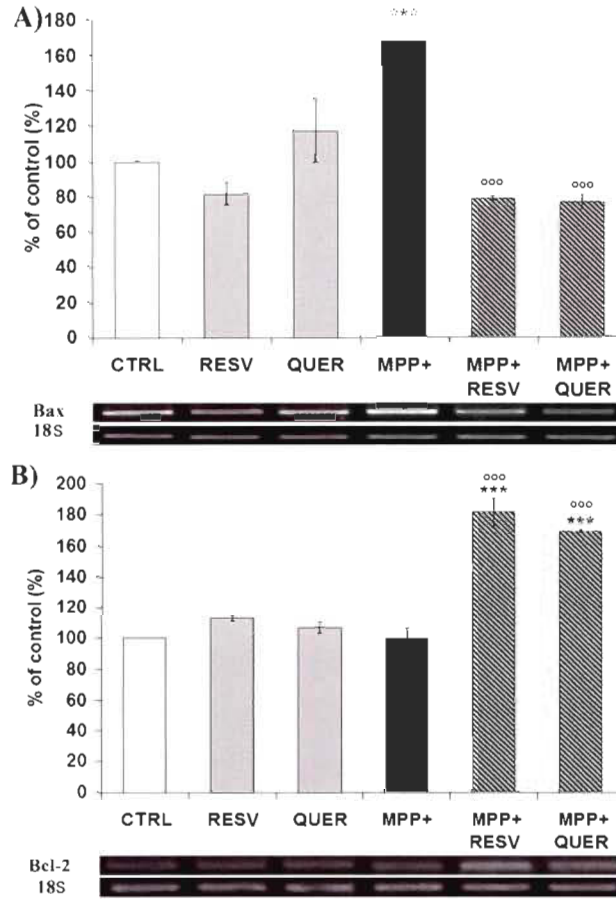


Figure 3:

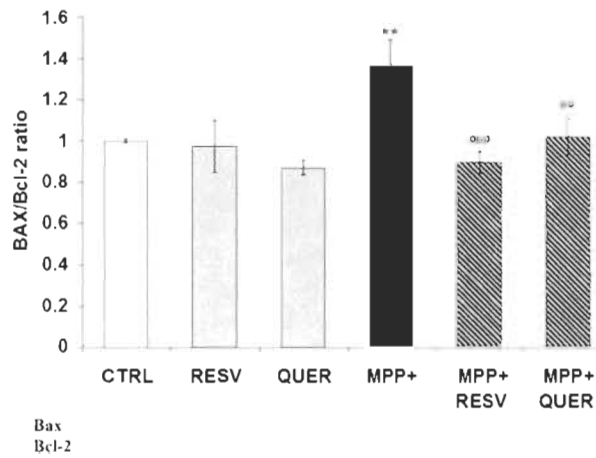


Figure 4:

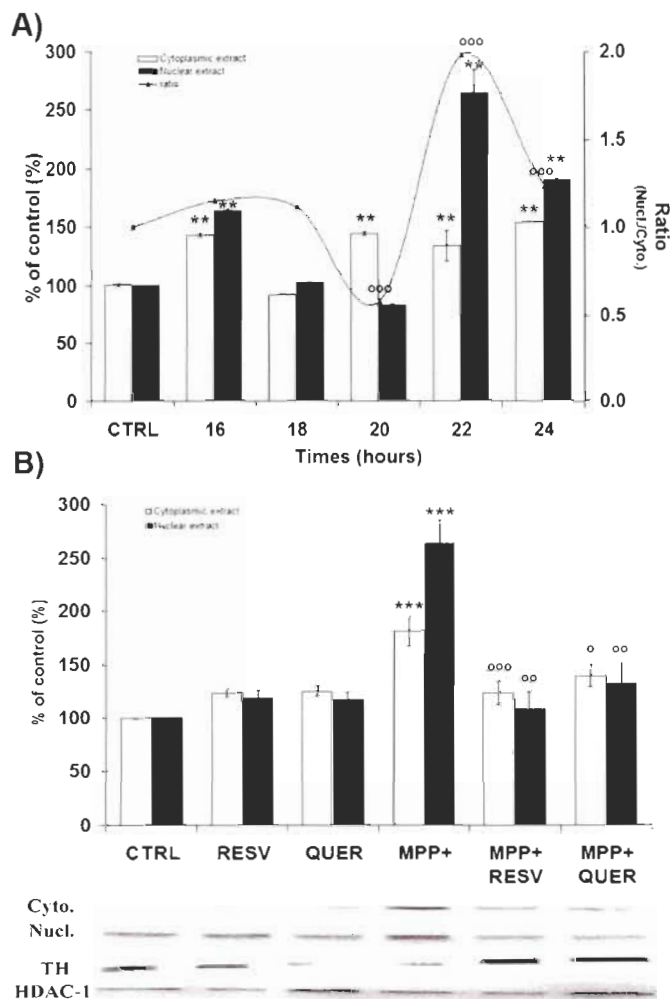
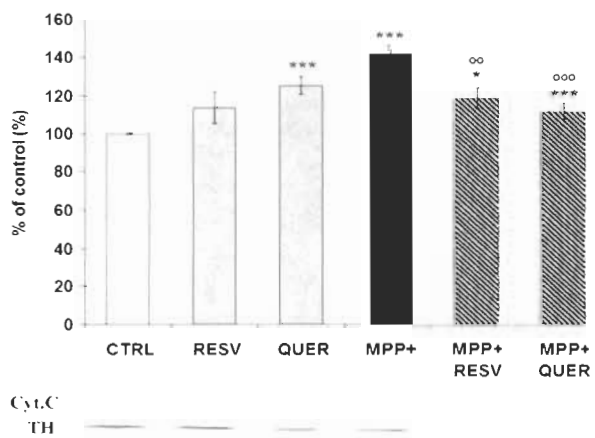


Figure 5:



CHAPITRE 5

CONCLUSION

La MP est caractérisée par la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire. La cause de cette perte massive et localisée est encore d'origine inconnue et les thérapies pharmacologiques disponibles aujourd'hui sont exclusivement symptomatiques. Elles s'attardent à améliorer les symptômes ou à la prévenir, mais toutefois sans s'attaquer à la cause de la maladie. Récemment, l'introduction de nouvelles stratégies thérapeutiques, en complément à la thérapie pharmacologique, a ouvert de nouvelles possibilités pour la prévention de la MP. La qualité de vie des patients s'en retrouve largement améliorée. À ce propos, nos travaux de recherche tentent de vérifier si le resvératrol et la quercétine pourraient être potentiellement utilisés dans le cadre de traitements complémentaires ou préventifs de la MP. Pour ce faire, les deux objectifs de recherche étaient distincts et ils portaient sur la capacité du resvératrol et de la quercétine à réduire la mort apoptotique de cellules neuronales et finalement, sur les mécanismes cellulaires pouvant être impliqués dans l'effet des deux polyphénols.

Nos résultats ont d'abord mis en évidence que le stress oxydatif induit par le MPP⁺ à 500µM cause la mort des cellules PC12 différenciées par un processus apoptotique, puisqu'il y a présence réelle de la fragmentation de l'ADN. Ce résultat est entièrement en accord avec les données présentes dans la littérature pour d'autres types cellulaires (Lee et al., 2006). De plus, le pré-traitement de ces cellules avec le resvératrol ou la quercétine avant l'ajout du MPP⁺, permet de réduire considérablement la quantité de noyaux en apoptose et de fragmentation de l'ADN comparativement aux cellules seulement traitées au MPP⁺. Ceci permet de conclure que le resvératrol et la quercétine réduisent la mort apoptotique des cellules neuronales.

D'un autre côté, nous devons vérifier les mécanismes cellulaires impliqués dans cette protection contre l'apoptose. Tout d'abord, j'ai analysé l'expression de gènes membres de la famille Bcl-2. Ces derniers possèdent principalement la fonction de promouvoir l'apoptose (Bax) ou bien de la contrecarrer (Bcl-2). Bax favorise l'augmentation de mort par apoptose dans le système nerveux (Vekrellis et al., 1997). Une surexpression de ce gène bloque aussi l'action de Bcl-2 (Oltvai et al., 1993). Bcl-2 a une activité anti-apoptotique, car il atténue l'activation des caspases et une surexpression protège les cellules neuronales contre l'effet de neurotoxine (Sawada et al., 2000b; Borg and London, 2002). Dans notre étude, nous avons démontré que le resvératrol et la quercétine réduisent la mort neuronale induite par un oxydant. Cette protection passe directement par une interférence dans le mécanisme mitochondrial Bax/Bcl-2. Le resvératrol et la quercétine réduisent l'expression de Bax et augmente l'expression de Bcl-2, ce qui entraîne une diminution globale de la mort neuronale apoptotique.

De plus pour confirmer ce résultat obtenu par la technique de RT-PCR, nous avons mesuré le niveau protéique de ces deux mêmes protéines. Nos résultats ont été exprimés en ratio Bax/Bcl-2, puisque ce rapport est bien connu pour corrélérer avec le processus d'apoptose (Wu et al., 2007a). Au niveau protéique, une augmentation dans le ratio Bax/Bcl-2 indique une prédisposition à l'apoptose (Korsmeyer et al., 1993). Nous avons démontré une augmentation du ratio Bax/Bcl-2 suite au traitement au MPP⁺. L'administration de resvératrol et de la quercétine avant l'ajout du MPP⁺ diminue ce ratio. Ce résultat suggère que le resvératrol et la quercétine peuvent diminuer la mort apoptotique induite par le MPP⁺ en agissant soit au niveau de l'expression génique (ARNm), soit de l'expression protéique.

D'autre part, la perturbation du potentiel transmembranaire mitochondrial est un évènement clé menant au relâchement du CytC et l'activation de la caspase-3 (Perkins et al., 2000). L'interaction du CytC avec la protéine Apaf-1 permet le

recrutement de la procaspase-9, suivi de l'activation de la caspase-3 et finalement, l'activation de la mort apoptotique (Smith et al., 2008). Il peut aussi survenir la relâche d'AIF, de la mitochondrie vers le noyau, qui mène au clivage de l'ADN chromosomique. Nos résultats présentent un fort relâchement du CytC et d'AIF en présence du MPP⁺, et un revirement de situation lorsque les cellules subissent un pré-traitement avec les deux polyphénols. Par ce résultat, nous supportons le potentiel anti-apoptotique du resvératrol et de la quercétine par une action au niveau de la relâche d'éléments mitochondriaux. Cependant, il faut noter que la quercétine semble à elle seule augmenter la relâche du CytC. Il semblerait donc que la quercétine se distingue du resvératrol sur cet effet. De plus, la protection apoptotique de la quercétine demeure, indiquant que la quercétine compense probablement cet effet sur un composant de la cascade apoptotique.

À la lumière de tous nos résultats, on peut conclure que le stress oxydant, induit par le MPP⁺ peut causer la mort par apoptose des neurones PC12 en culture. Ces résultats représentent la situation chez un patient parkinsonien, puisqu'il est bien démontré que les neurones dopaminergiques d'un patient meurent par apoptose (Hirsch et al., 1999). L'utilisation du resvératrol et de la quercétine permet de réduire la mort apoptotique induite par le stress oxydant suite à différentes modulations favorisant la survie cellulaire. En conclusion, le resvératrol et la quercétine ont un potentiel fort intéressant en tant que thérapie préventive et pourraient être utilisés en recherche clinique comme thérapie complémentaire aux traitements pharmacologiques conventionnels. Évidemment, la reproduction de tous nos résultats dans un système *in vivo* apporterait une preuve plus évidente que l'effet anti-apoptotique du resvératrol et de la quercétine est applicable à l'humain.

Pour des travaux futurs, il serait intéressant de poursuivre ce projet en vérifiant les interactions qui surviennent entre certains composants de la cascade apoptotique. En effet, on pourrait vérifier la capacité de liaison entre Bcl-2, Bax

et le canal permettant la sortie du CytC. Il serait fort captivant de vérifier la modulation d'AIF mitochondrial. Ceci nous donnerait des indices plus précis sur l'influence du resvératrol et de la quercétine sur la redistribution d'AIF. Par conséquent, il faudrait comprendre plus en profondeur les mécanismes d'apoptose reliés à AIF. De plus, on devrait mettre en évidence la production d'oxyde nitrique et l'activation de PARP-1 qui sont intimement reliées au mécanisme cellulaire d'AIF. Bien que notre projet ce soit concentré sur les mécanismes de mort, il serait fort appréciable de vérifier les mécanismes de survie (ex : protéine de choc thermique). En effet, la réponse des protéines de choc thermique (HSP 70) contribue grandement à établir un état protecteur dans une grande variété de maladie et tout particulièrement dans les maladies neurodégénératives.

BIBLIOGRAPHIE

- Abou-Sleiman PM, Muqit MM, Wood NW (2006) Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 7:207-219.
- Abou-Sleiman PM, Healy DG, Quinn N, Lees AJ, Wood NW (2003) The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54:283-286.
- Akaneya Y, Takahashi M, Hatanaka H (1995) Involvement of free radicals in MPP+ neurotoxicity against rat dopaminergic neurons in culture. *Neurosci Lett* 193:53-56.
- Alam ZI, Daniel SE, Lees AJ, Marsden DC, Jenner P, Halliwell B (1997a) A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *J Neurochem* 69:1326-1329.
- Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD, Jenner P, Halliwell B (1997b) Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem* 69:1196-1203.
- Alexaki VI, Charalampopoulos I, Kampa M, Vassalou H, Theodoropoulos P, Stathopoulos EN, Hatzoglou A, Gravanis A, Castanas E (2004) Estrogen exerts neuroprotective effects via membrane estrogen receptors and rapid Akt/NOS activation. *Faseb J* 18:1594-1596.
- Alkayed NJ, Goto S, Sugo N, Joh HD, Klaus J, Crain BJ, Bernard O, Traystman RJ, Hurn PD (2001) Estrogen and Bcl-2: gene induction and effect of transgene in experimental stroke. *J Neurosci* 21:7543-7550.
- Alvira D, Yeste-Velasco M, Folch J, Verdaguer E, Canudas AM, Pallas M, Camins A (2007) Comparative analysis of the effects of resveratrol in two apoptotic models: inhibition of complex I and potassium deprivation in cerebellar neurons. *Neuroscience* 147:746-756.
- Amantea D, Russo R, Bagetta G, Corasaniti MT (2005) From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacol Res* 52:119-132.
- Ando A, Yamazaki Y, Kaneko S, Miyake M, Nambu R, Taomoto M, Unezaki S, Okuda-Ashitaka E, Okumura T, Ito S, Matsumura M (2005) Cytoprotection by nipradilol, an anti-glaucomatous agent, via down-regulation of apoptosis related gene expression and activation of NF-kappaB. *Exp Eye Res* 80:501-507.

- Andrews ZB, Horvath B, Barnstable CJ, Elsworth J, Yang L, Beal MF, Roth RH, Matthews RT, Horvath TL (2005) Uncoupling protein-2 is critical for nigral dopamine cell survival in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 25:184-191.
- Anekonda TS (2006) Resveratrol--a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev* 52:316-326.
- Ansari MA, Abdul HM, Joshi G, Opii WO, Butterfield DA (2008) Protective effect of quercetin in primary neurons against Abeta(1-42): relevance to Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem*.
- Aquilano K, Baldelli S, Rotilio G, Ciriolo MR (2008) Role of Nitric Oxide Synthases in Parkinson's Disease: A Review on the Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Polyphenols. *Neurochem Res*.
- Aranda A, Pascual A (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81:1269-1304.
- ASRM (2008) Estrogen and progestogen therapy in postmenopausal women. *Fertil Steril* 90:S88-102.
- Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Nadoushan MR, Bagheri M (2008) Neuroprotective effect of genistein in 6-hydroxydopamine Hemiparkinsonian rat model. *Phytother Res*.
- Baur JA, Sinclair DA (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5:493-506.
- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444:337-342.
- Beal MF (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2:325-334.
- Behl C (2002) Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nat Rev Neurosci* 3:433-442.
- Behl C, Manthey D (2000) Neuroprotective activities of estrogen: an update. *J Neurocytol* 29:351-358.

- Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F (1997) Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* 51:535-541.
- Belguendouz L, Fremont L, Linard A (1997) Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochem Pharmacol* 53:1347-1355.
- Benabid AL, Pollak P, Louveau A, Henry S, de Rougemont J (1987) Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Appl Neurophysiol* 50:344-346.
- Bertelli AA, Giovannini L, Giannessi D, Migliori M, Bernini W, Fregoni M, Bertelli A (1995) Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int J Tissue React* 17:1-3.
- Bertram L, Tanzi RE (2005) The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 115:1449-1457.
- Bezard E, Gross CE, Fournier MC, Dovero S, Bloch B, Jaber M (1999) Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. *Exp Neurol* 155:268-273.
- Bhavnani BR (2003) Estrogens and menopause: pharmacology of conjugated equine estrogens and their potential role in the prevention of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85:473-482.
- Blanchet J, Longpre F, Bureau G, Morissette M, DiPaolo T, Bronchti G, Martinoli MG (2008) Resveratrol, a red wine polyphenol, protects dopaminergic neurons in MPTP-treated mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32:1243-1250.
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299:256-259.
- Bonifati V, Rohe CF, Breedveld GJ, Fabrizio E, De Mari M, Tassorelli C, Tavella A, Marconi R, Nicholl DJ, Chien HF, Fincati E, Abbruzzese G, Marini P, De Gaetano A, Horstink MW, Maat-Kievit JA, Sampaio C, Antonini A, Stocchi F, Montagna P, Toni V, Guidi M, Dalla Libera A, Tinazzi M, De Pandis F, Fabbrini G, Goldwurm S, de Klein A, Barbosa E, Lopiano L, Martignoni E, Lamberti P, Vanacore N, Meco G, Oostra BA (2005) Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotypes, and phenotypes. *Neurology* 65:87-95.

- Bonnet AM, Houeto JL (1999) Pathophysiology of Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother* 53:117-121.
- Borg J, London J (2002) Copper/zinc superoxide dismutase overexpression promotes survival of cortical neurons exposed to neurotoxins in vitro. *J Neurosci Res* 70:180-189.
- Borie C, Gasparini F, Verpillat P, Bonnet AM, Agid Y, Hetet G, Brice A, Durr A, Grandchamp B (2002) Association study between iron-related genes polymorphisms and Parkinson's disease. *J Neurol* 249:801-804.
- Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, Klinge CM (2000) Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 141:3657-3667.
- Bowling AC, Beal MF (1995) Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci* 56:1151-1171.
- Brookes PS, Digerness SB, Parks DA, Darley-Usmar V (2002) Mitochondrial function in response to cardiac ischemia-reperfusion after oral treatment with quercetin. *Free Radic Biol Med* 32:1220-1228.
- Brown GC, Borutaite V (2004) Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta* 1658:44-49.
- Bruce-Keller AJ, Keeling JL, Keller JN, Huang FF, Camondola S, Mattson MP (2000) Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology* 141:3646-3656.
- Bukhari SB, Memon S, Mahroof-Tahir M, Bhanger MI (2008) Synthesis, characterization and antioxidant activity copper-quercetin complex. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.*
- Burch D, Sheerin F (2005) Parkinson's disease. *Lancet* 365:622-627.
- Bureau G, Longpre F, Martinoli MG (2008) Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. *J Neurosci Res* 86:403-410.
- Callier S, Morissette M, Grandbois M, Di Paolo T (2000) Stereospecific prevention by 17beta-estradiol of MPTP-induced dopamine depletion in mice. *Synapse* 37:245-251.
- Calne DB, Teychenne PF, Claveria LE, Eastman R, Greenacre JK, Petrie A (1974) Bromocriptine in Parkinsonism. *Br Med J* 4:442-444.

- Calon F, Lavertu N, Lemieux AM, Morissette M, Goulet M, Grondin R, Blanchet PJ, Bedard PJ, Di Paolo T (2001) Effect of MPTP-induced denervation on basal ganglia GABA(B) receptors: correlation with dopamine concentrations and dopamine transporter. *Synapse* 40:225-234.
- Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, Baptista MJ, Ringe D, Petsko GA, Cookson MR (2004) The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9103-9108.
- Casagrande F, Darbon JM (2001) Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol* 61:1205-1215.
- Chalimoniuk M, Snoek GT, Adamczyk A, Malecki A, Strosznajder JB (2006) Phosphatidylinositol transfer protein expression altered by aging and Parkinson disease. *Cell Mol Neurobiol* 26:1153-1166.
- Charalampopoulos I, Tsatsanis C, Dermitzaki E, Alexaki VI, Castanas E, Margioris AN, Gravanis A (2004) Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via antiapoptotic Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8209-8214.
- Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8:705-711.
- Chiasson K, Lahaie-Collins V, Bournival J, Delapierre B, Gelinis S, Martinoli MG (2006) Oxidative stress and 17-alpha- and 17-beta-estradiol modulate neurofilaments differently. *J Mol Neurosci* 30:297-310.
- Chiba K, Trevor A, Castagnoli N, Jr. (1984) Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 120:574-578.
- Collins JA, Blake JM, Crosignani PG (2005) Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment. *Hum Reprod Update* 11:545-560.
- Cooper IS (1953) Ligation of the anterior choroidal artery for involuntary movements; parkinsonism. *Psychiatr Q* 27:317-319.
- Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2:647-656.

- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Vanwoert MH, Sakamoto A (1964) Melanogenesis and Extrapyrarnidal Diseases. *Fed Proc* 23:713-718.
- Cowen D (1986) The melanoneurons of the human cerebellum (nucleus pigmentosus cerebellaris) and homologues in the monkey. *J Neuropathol Exp Neurol* 45:205-221.
- Currie LJ, Harrison MB, Trugman JM, Bennett JP, Wooten GF (2004) Postmenopausal estrogen use affects risk for Parkinson disease. *Arch Neurol* 61:886-888.
- Cushnie TP, Lamb AJ (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 26:343-356.
- Dalfo E, Ferrer I (2008) Early alpha-synuclein lipoxidation in neocortex in Lewy body diseases. *Neurobiol Aging* 29:408-417.
- Dalia A, Neff NH, Hadjiconstantinou M (1996) Tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase in mesencephalic cultures after MPP+: the consequences of treatment with GM1 ganglioside. *Brain Res* 742:260-264.
- Danielson SR, Andersen JK (2008) Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 44:1787-1794.
- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909.
- Davies KJ (2000) Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50:279-289.
- Dawson TM (2000) New animal models for Parkinson's disease. *Cell* 101:115-118.
- de la Lastra CA, Villegas I (2005) Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. *Mol Nutr Food Res* 49:405-430.
- de Lau LM, Breteler MM (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5:525-535.
- Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P, Marsden CD (1989) Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem* 52:381-389.

- Dluzen D, Horstink M (2003) Estrogen as neuroprotectant of nigrostriatal dopaminergic system: laboratory and clinical studies. *Endocrine* 21:67-75.
- Dong Z (2003) Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutat Res* 523-524:145-150.
- Dore S (2005) Unique properties of polyphenol stilbenes in the brain: more than direct antioxidant actions; gene/protein regulatory activity. *Neurosignals* 14:61-70.
- Double KL, Halliday GM (2006) New face of neuromelanin. *J Neural Transm Suppl*:119-123.
- Du Y, Dodel RC, Bales KR, Jemmerson R, Hamilton-Byrd E, Paul SM (1997) Involvement of a caspase-3-like cysteine protease in 1-methyl-4-phenylpyridinium-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 69:1382-1388.
- Ehringer H, Hornykiewicz O (1960) [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system.]. *Klin Wochenschr* 38:1236-1239.
- Encarnacion EV, Hauser RA (2008) Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: etiology, impact on quality of life, and treatments. *Eur Neurol* 60:57-66.
- Esposito E, Rotilio D, Di Matteo V, Di Giulio C, Cacchio M, Algeri S (2002) A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiol Aging* 23:719-735.
- Ferri KF, Kroemer G (2001) Mitochondria--the suicide organelles. *Bioessays* 23:111-115.
- Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG (1993) Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol* 265:H774-778.
- Formica JV, Regelson W (1995) Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 33:1061-1080.
- Fornai F, Soldani P, Lazzeri G, di Poggio AB, Biagioni F, Fulceri F, Batini S, Ruggieri S, Paparelli A (2005) Neuronal inclusions in degenerative disorders Do they represent static features or a key to understand the dynamics of the disease? *Brain Res Bull* 65:275-290.

- Frankfurt OS, Krishan A (2001) Identification of apoptotic cells by formamide-induced dna denaturation in condensed chromatin. *J Histochem Cytochem* 49:369-378.
- Fukui H, Moraes CT (2008) The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis? *Trends Neurosci* 31:251-256.
- Gadelha FR, Thomson L, Fagian MM, Costa AD, Radi R, Vercesi AE (1997) Ca²⁺-independent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by peroxyxynitrite is mediated by membrane protein thiol cross-linking and lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 345:243-250.
- Gagne B, Gelinas S, Bureau G, Lagace B, Ramassamy C, Chiasson K, Valastro B, Martinoli MG (2003) Effects of estradiol, phytoestrogens, and Ginkgo biloba extracts against 1-methyl-4-phenyl-pyridine-induced oxidative stress. *Endocrine* 21:89-95.
- Gao HM, Hong JS, Zhang W, Liu B (2002) Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurosci* 22:782-790.
- Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS (2003) Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease. *Faseb J* 17:1954-1956.
- Garcia-Segura LM, Cardona-Gomez P, Naftolin F, Chowen JA (1998) Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. *Neuroreport* 9:593-597.
- Gelinas S, Martinoli MG (2002) Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP⁺-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells. *J Neurosci Res* 70:90-96.
- Gelinas S, Bureau G, Valastro B, Massicotte G, Cicchetti F, Chiasson K, Gagne B, Blanchet J, Martinoli MG (2004) Alpha and beta estradiol protect neuronal but not native PC12 cells from paraquat-induced oxidative stress. *Neurotox Res* 6:141-148.
- Gildenberg PL (1998) The history of surgery for movement disorders. *Neurosurg Clin N Am* 9:283-294.
- Gilks WP, Abou-Sleiman PM, Gandhi S, Jain S, Singleton A, Lees AJ, Shaw K, Bhatia KP, Bonifati V, Quinn NP, Lynch J, Healy DG, Holton JL, Revesz T, Wood NW (2005) A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* 365:415-416.

- Gille G, Rausch WD, Hung ST, Moldzio R, Janetzky B, Hundemer HP, Kolter T, Reichmann H (2002a) Pergolide protects dopaminergic neurons in primary culture under stress conditions. *J Neural Transm* 109:633-643.
- Gille G, Rausch WD, Hung ST, Moldzio R, Ngyuen A, Janetzky B, Engfer A, Reichmann H (2002b) Protection of dopaminergic neurons in primary culture by lisuride. *J Neural Transm* 109:157-169.
- Goedert M (2001) Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2:492-501.
- Gollapudi L, Oblinger MM (1999) Stable transfection of PC12 cells with estrogen receptor (ERalpha): protective effects of estrogen on cell survival after serum deprivation. *J Neurosci Res* 56:99-108.
- Gollapudi S, McCormick MJ, Gupta S (2003) Changes in mitochondrial membrane potential and mitochondrial mass occur independent of the activation of caspase-8 and caspase-3 during CD95-mediated apoptosis in peripheral blood T cells. *Int J Oncol* 22:597-600.
- Gonzales AM, Orlando RA (2008) Curcumin and resveratrol inhibit nuclear factor-kappaB-mediated cytokine expression in adipocytes. *Nutr Metab (Lond)* 5:17.
- Graham DG (1978) Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol* 14:633-643.
- Graham DG (1979) On the origin and significance of neuromelanin. *Arch Pathol Lab Med* 103:359-362.
- Grandbois M, Morissette M, Callier S, Di Paolo T (2000) Ovarian steroids and raloxifene prevent MPTP-induced dopamine depletion in mice. *Neuroreport* 11:343-346.
- Greene LA (1978) Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. *J Cell Biol* 78:747-755.
- Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:2424-2428.
- Gromadzinska J, Wasowicz W (2000) The role of reactive oxygen species in the development of malignancies. *Int J Occup Med Environ Health* 13:233-245.

- Guo M, Perez C, Wei Y, Rapoza E, Su G, Bou-Abdallah F, Chasteen ND (2007) Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. *Dalton Trans*:4951-4961.
- Gutteridge JM (1993) Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun* 19:141-158.
- Haan C, Behrmann I (2007) A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *J Immunol Methods* 318:11-19.
- Halliwell B (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609-1623.
- Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S (1994) The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 16:845-850.
- Hantraye P, Brouillet E, Ferrante R, Palfi S, Dolan R, Matthews RT, Beal MF (1996) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. *Nat Med* 2:1017-1021.
- Hartley A, Stone JM, Heron C, Cooper JM, Schapira AH (1994) Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 63:1987-1990.
- He Y, Appel S, Le W (2001) Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res* 909:187-193.
- Heikkila RE, Sieber BA, Manzino L, Sonsalla PK (1989) Some features of the nigrostriatal dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse. *Mol Chem Neuropathol* 10:171-183.
- Heo HJ, Lee CY (2004) Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. *J Agric Food Chem* 52:7514-7517.
- Hirsch EC, Hunot S, Faucheux B, Agid Y, Mizuno Y, Mochizuki H, Tatton WG, Tatton N, Olanow WC (1999) Dopaminergic neurons degenerate by apoptosis in Parkinson's disease. *Mov Disord* 14:383-385.
- Hoozemans JJ, Veerhuis R, Janssen I, van Elk EJ, Rozemuller AJ, Eikelenboom P (2002) The role of cyclo-oxygenase 1 and 2 activity in prostaglandin E(2) secretion by cultured human adult microglia: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res* 951:218-226.

- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425:191-196.
- Huang C, Ma WY, Goranson A, Dong Z (1999) Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Carcinogenesis* 20:237-242.
- Ishikawa Y, Kitamura M (2000) Anti-apoptotic effect of quercetin: intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways. *Kidney Int* 58:1078-1087.
- Itano Y, Nomura Y (1995) 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion (MPP+) causes DNA fragmentation and increases the Bcl-2 expression in human neuroblastoma, SH-SY5Y cells, through different mechanisms. *Brain Res* 704:240-245.
- Jakowec MW, Nixon K, Hogg E, McNeill T, Petzinger GM (2004) Tyrosine hydroxylase and dopamine transporter expression following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration of the mouse nigrostriatal pathway. *J Neurosci Res* 76:539-550.
- Jakubowicz-Gil J, Rzeski W, Zdzisinska B, Dobrowolski P, Gawron A (2008a) Cell death and neuronal arborization upon quercetin treatment in rat neurons. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 68:139-146.
- Jakubowicz-Gil J, Rzeski W, Zdzisinska B, Piersiak T, Weiksza K, Glowniak K, Gawron A (2008b) Different sensitivity of neurons and neuroblastoma cells to quercetin treatment. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 68:463-476.
- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275:218-220.
- Jang MH, Piao XL, Kim HY, Cho EJ, Baek SH, Kwon SW, Park JH (2007) Resveratrol oligomers from *Vitis amurensis* attenuate beta-amyloid-induced oxidative stress in PC12 cells. *Biol Pharm Bull* 30:1130-1134.
- Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH (1985) Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:2173-2177.
- Jenner P (1991) Oxidative stress as a cause of Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 136:6-15.

- Jenner P (1998) Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord* 13 Suppl 1:24-34.
- Jenner P, Olanow CW (2006) The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Neurology* 66:S24-36.
- Jenner P, Dexter DT, Sian J, Schapira AH, Marsden CD (1992) Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. *Ann Neurol* 32 Suppl:S82-87.
- Ji C, Amarnath V, Pietenpol JA, Marnett LJ (2001) 4-hydroxynonenal induces apoptosis via caspase-3 activation and cytochrome c release. *Chem Res Toxicol* 14:1090-1096.
- Jung JY, Roh KH, Jeong YJ, Kim SH, Lee EJ, Kim MS, Oh WM, Oh HK, Kim WJ (2008) Estradiol protects PC12 cells against CoCl₂-induced apoptosis. *Brain Res Bull* 76:579-585.
- Kadota T, Yamaai T, Saito Y, Akita Y, Kawashima S, Moroi K, Inagaki N, Kadota K (1996) Expression of dopamine transporter at the tips of growing neurites of PC12 cells. *J Histochem Cytochem* 44:989-996.
- Kastner A, Hirsch EC, Lejeune O, Javoy-Agid F, Rascol O, Agid Y (1992) Is the vulnerability of neurons in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease related to their neuromelanin content? *J Neurochem* 59:1080-1089.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392:605-608.
- Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR, Newmeyer DD (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275:1132-1136.
- Kopin IJ, Markey SP (1988) MPTP toxicity: implications for research in Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 11:81-96.
- Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN (1993) Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 4:327-332.
- Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH (2000) Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7:1166-1173.

- Kowaltowski AJ, Vercesi AE, Fiskum G (2000) Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition and cytochrome c release via maintenance of reduced pyridine nucleotides. *Cell Death Differ* 7:903-910.
- Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R (2007) Apoptosis-inducing factor: a matter of neuron life and death. *Prog Neurobiol* 81:179-196.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139:4252-4263.
- Kunikowska G, Jenner P (2003) Alterations in m-RNA expression for Cu,Zn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the basal ganglia of MPTP-treated marmosets and patients with Parkinson's disease. *Brain Res* 968:206-218.
- Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, Green DR, Newmeyer DD (2002) Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111:331-342.
- Lahaie-Collins V, Bournival J, Plouffe M, Carange J, Martinoli MG (2008) Sesamin modulates tyrosine hydroxylase, superoxide dismutase, catalase, inducible NO synthase and interleukin-6 expression in dopaminergic cells under MPP⁺-induced oxidative stress. *Oxidative Medicine & Cellular Longevity* 1:53-61.
- Landis GN, Tower J (2005) Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev* 126:365-379.
- Langston JW, Ballard PA, Jr. (1983) Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med* 309:310.
- Langston JW, Irwin I (1986) MPTP: current concepts and controversies. *Clin Neuropharmacol* 9:485-507.
- LaVoie MJ, Hastings TG (1999) Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine. *J Neurosci* 19:1484-1491.
- Lee CS, Han ES, Kim YK (2006) Piperine inhibition of 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced mitochondrial dysfunction and cell death in PC12 cells. *Eur J Pharmacol* 537:37-44.
- Lee KW, Kang NJ, Heo YS, Rogozin EA, Pugliese A, Hwang MK, Bowden GT, Bode AM, Lee HJ, Dong Z (2008) Raf and MEK protein kinases are direct

molecular targets for the chemopreventive effect of quercetin, a major flavonol in red wine. *Cancer Res* 68:946-955.

Lee MK, Kang SJ, Poncz M, Song KJ, Park KS (2007) Resveratrol protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from apoptosis induced by dopamine. *Exp Mol Med* 39:376-384.

Lee V, Trojanowski JQ, Schlaepfer WW (1982) Induction of neurofilament triplet proteins in PC12 cells by nerve growth factor. *Brain Res* 238:169-180.

Lim JH, Kim KM, Kim SW, Hwang O, Choi HJ (2008) Bromocriptine activates NQO1 via Nrf2-PI3K/Akt signaling: novel cytoprotective mechanism against oxidative damage. *Pharmacol Res* 57:325-331.

Lincoln S, Wiley J, Lynch T, Langston JW, Chen R, Lang A, Rogaeva E, Sa DS, Munhoz RP, Harris J, Marder K, Klein C, Bisceglia G, Hussey J, West A, Hulihan M, Hardy J, Farrer M (2003) Parkin-proven disease: common founders but divergent phenotypes. *Neurology* 60:1605-1610.

Linford NJ, Dorsa DM (2002) 17beta-Estradiol and the phytoestrogen genistein attenuate neuronal apoptosis induced by the endoplasmic reticulum calcium-ATPase inhibitor thapsigargin. *Steroids* 67:1029-1040.

Liou AK, Zhou Z, Pei W, Lim TM, Yin XM, Chen J (2005) BimEL up-regulation potentiates AIF translocation and cell death in response to MPTP. *FASEB J* 19:1350-1352.

Lo FH, Mak NK, Leung KN (2007) Studies on the anti-tumor activities of the soy isoflavone daidzein on murine neuroblastoma cells. *Biomed Pharmacother* 61:591-595.

Lotharius J, Brundin P (2002) Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci* 3:932-942.

Marttila RJ, Lorentz H, Rinne UK (1988) Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease. Increase of superoxide dismutase-like activity in the substantia nigra and basal nucleus. *J Neurol Sci* 86:321-331.

Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32:595-603.

McBurney MW, Yang X, Jardine K, Hixon M, Boekelheide K, Webb JR, Lansdorp PM, Lemieux M (2003) The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. *Mol Cell Biol* 23:38-54.

McNaught KS, Olanow CW (2006) Protein aggregation in the pathogenesis of familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 27:530-545.

- Meng XL, Yang JY, Chen GL, Wang LH, Zhang LJ, Wang S, Li J, Wu CF (2008) Effects of resveratrol and its derivatives on lipopolysaccharide-induced microglial activation and their structure-activity relationships. *Chem Biol Interact* 174:51-59.
- Mercer LD, Kelly BL, Horne MK, Beart PM (2005) Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. *Biochem Pharmacol* 69:339-345.
- Miura D, Miura Y, Yagasaki K (2003) Hypolipidemic action of dietary resveratrol, a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatoma-bearing rats. *Life Sci* 73:1393-1400.
- Mizuno Y, Hattori N, Mori H, Suzuki T, Tanaka K (2001) Parkin and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 14:477-482.
- Mochizuki H, Goto K, Mori H, Mizuno Y (1996) Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 137:120-123.
- Moosmann B, Behl C (1999) The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8867-8872.
- Morale MC, Serra PA, L'Episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, Testa N, Gennuso F, Giaquinta G, Rocchitta G, Desole MS, Miele E, Marchetti B (2006) Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience* 138:869-878.
- Mytilineou (2001) Mechanism of MPTP neurotoxicity. *Mechanisms of Degeneration and Protection of the Dopaminergic System*, Johnson City, TN: FP Graham Publ.
- Nakai M, Mori A, Watanabe A, Mitsumoto Y (2003) 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) decreases mitochondrial oxidation-reduction (REDOX) activity and membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in rat striatum. *Exp Neurol* 179:103-110.
- Natale G, Pasquali L, Ruggieri S, Paparelli A, Fornai F (2008) Parkinson's disease and the gut: a well known clinical association in need of an effective cure and explanation. *Neurogastroenterol Motil* 20:741-749.
- Nguyen A, Gille G, Moldzio R, Hung ST, Rausch WD (2002) Synthetic neuromelanin is toxic to dopaminergic cell cultures. *J Neural Transm* 109:651-661.

- Nilsen J, Mor G, Naftolin F (1998) Raloxifene induces neurite outgrowth in estrogen receptor positive PC12 cells. *Menopause* 5:211-216.
- Offen D, Beart PM, Cheung NS, Pascoe CJ, Hochman A, Gorodin S, Melamed E, Bernard R, Bernard O (1998) Transgenic mice expressing human Bcl-2 in their neurons are resistant to 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5789-5794.
- Okawara M, Katsuki H, Kurimoto E, Shibata H, Kume T, Akaike A (2007) Resveratrol protects dopaminergic neurons in midbrain slice culture from multiple insults. *Biochem Pharmacol* 73:550-560.
- Olanow CW, Brin MF, Obeso JA (2000) The role of deep brain stimulation as a surgical treatment for Parkinson's disease. *Neurology* 55:S60-66.
- Olanow CW, Perl DP, DeMartino GN, McNaught KS (2004) Lewy-body formation is an aggregates-related process: a hypothesis. *Lancet Neurol* 3:496-503.
- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609-619.
- Orallo F (2006) Comparative studies of the antioxidant effects of cis- and trans-resveratrol. *Curr Med Chem* 13:87-98.
- Orth M, Tabrizi SJ (2003) Models of Parkinson's disease. *Mov Disord* 18:729-737.
- Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM (1996) Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 87:803-809.
- Ouyang YB, Carriedo SG, Giffard RG (2002) Effect of Bcl-x(L) overexpression on reactive oxygen species, intracellular calcium, and mitochondrial membrane potential following injury in astrocytes. *Free Radic Biol Med* 33:544-551.
- Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Rudolph A, Shults C, Conneally PM, Foroud T (2002) Genome screen to identify susceptibility genes for Parkinson disease in a sample without parkin mutations. *Am J Hum Genet* 71:124-135.
- Parysek LM, Goldman RD (1987) Characterization of intermediate filaments in PC12 cells. *J Neurosci* 7:781-791.

- Perkins CL, Fang G, Kim CN, Bhalla KN (2000) The role of Apaf-1, caspase-9, and bid proteins in etoposide- or paclitaxel-induced mitochondrial events during apoptosis. *Cancer Res* 60:1645-1653.
- Perry TL, Yong VW (1986) Idiopathic Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and glutathione metabolism in the substantia nigra of patients. *Neurosci Lett* 67:269-274.
- Piga R, Saito Y, Yoshida Y, Niki E (2007) Cytotoxic effects of various stressors on PC12 cells: involvement of oxidative stress and effect of antioxidants. *Neurotoxicology* 28:67-75.
- Pollak P (2004) *La maladie de Parkinson*. France.
- Polster BM, Kinnally KW, Fiskum G (2001) BH3 death domain peptide induces cell type-selective mitochondrial outer membrane permeability. *J Biol Chem* 276:37887-37894.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-2047.
- Przedborski S, Vila M (2003) The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991:189-198.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Djaldetti R, Liberatore G, Vila M, Vukosavic S, Almer G (2000) The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restor Neurol Neurosci* 16:135-142.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini AB, Jakowec M, Petzinger G, Miller R, Akram M (2001) The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J Neurochem* 76:1265-1274.
- Purdie DW (2000) Consequences of long-term hormone replacement therapy. *Br Med Bull* 56:809-823.
- Rachon D, Teede H (2008) Postmenopausal hormone therapy and the risk of venous thromboembolism. *Climacteric* 11:273-279.
- Rajput AH, Birdi S (1997) Epidemiology of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 3:175-186.

- Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, De Deyn PP, Clarke CE, Lang AE (2000) A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. 056 Study Group. *N Engl J Med* 342:1484-1491.
- Raza H, John A, Brown EM, Benedict S, Kambal A (2008) Alterations in mitochondrial respiratory functions, redox metabolism and apoptosis by oxidant 4-hydroxynonenal and antioxidants curcumin and melatonin in PC12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 226:161-168.
- Reed JC, Jurgensmeier JM, Matsuyama S (1998) Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1366:127-137.
- Reichmann H (2000) Long-term treatment with dopamine agonists in idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol* 247 Suppl 4:IV/17-19.
- Renaud S, de Lorgeril M (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339:1523-1526.
- Ribeiro de Lima MT, Waffo-Teguo P, Teissedre PL, Pujolas A, Vercauteren J, Cabanis JC, Merillon JM (1999) Determination of stilbenes (trans-astringin, cis- and trans-piceid, and cis- and trans-resveratrol) in Portuguese wines. *J Agric Food Chem* 47:2666-2670.
- Riederer P, Sofic E, Rausch WD, Schmidt B, Reynolds GP, Jellinger K, Youdim MB (1989) Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J Neurochem* 52:515-520.
- Robb EL, Page MM, Wiens BE, Stuart JA (2008) Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD. *Biochem Biophys Res Commun* 367:406-412.
- Rogaeva E, Johnson J, Lang AE, Gulick C, Gwinn-Hardy K, Kawarai T, Sato C, Morgan A, Werner J, Nussbaum R, Petit A, Okun MS, McInerney A, Mandel R, Groen JL, Fernandez HH, Postuma R, Foote KD, Salehi-Rad S, Liang Y, Reimsnider S, Tandon A, Hardy J, St George-Hyslop P, Singleton AB (2004) Analysis of the PINK1 gene in a large cohort of cases with Parkinson disease. *Arch Neurol* 61:1898-1904.
- Ross JA, Kasum CM (2002) Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 22:19-34.
- Rousseau J, Cossette L, Grenier S, Martinoli MG (2002) Modulation of prolactin expression by xenoestrogens. *Gen Comp Endocrinol* 126:175-182.

- Ryu EJ, Angelastro JM, Greene LA (2005) Analysis of gene expression changes in a cellular model of Parkinson disease. *Neurobiol Dis* 18:54-74.
- Saggu H, Cooksey J, Dexter D, Wells FR, Lees A, Jenner P, Marsden CD (1989) A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra. *J Neurochem* 53:692-697.
- Saha RN, Pahan K (2006) Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal* 8:929-947.
- Sasaki M, Nakamura H, Tsuchiya S, Horie S, Kashiwayanagi M, Saito T, Murayama T (2007) Quercetin-induced PC12 cell death accompanied by caspase-mediated DNA fragmentation. *Biol Pharm Bull* 30:682-686.
- Sawada H, Shimohama S (2000) Neuroprotective effects of estradiol in mesencephalic dopaminergic neurons. *Neurosci Biobehav Rev* 24:143-147.
- Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Akaike A, Shimohama S (1998) Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal death. *J Neurosci Res* 54:707-719.
- Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Honda K, Nakanishi M, Akaike A, Shimohama S (2000a) Mechanisms of antiapoptotic effects of estrogens in nigral dopaminergic neurons. *Faseb J* 14:1202-1214.
- Sawada M, Nakashima S, Banno Y, Yamakawa H, Takenaka K, Shinoda J, Nishimura Y, Sakai N, Nozawa Y (2000b) Influence of Bax or Bcl-2 overexpression on the ceramide-dependent apoptotic pathway in glioma cells. *Oncogene* 19:3508-3520.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA (2000) Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 46:69-81.
- Schrerer H (1939) Melanin pigmentation of the substantia nigra in primates. *J Comp Neurol*:71-91.
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J (2000) Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 267:4904-4911.
- Segura Aguilar J, Kostorzewa RM (2004) Neurotoxins and neurotoxic species implicated in neurodegeneration. *Neurotox Res* 6:615-630.
- Sengstock GJ, Olanow CW, Dunn AJ, Barone S, Jr., Arendash GW (1994) Progressive changes in striatal dopaminergic markers, nigral volume, and

- rotational behavior following iron infusion into the rat substantia nigra. *Exp Neurol* 130:82-94.
- Sengupta A, Ghosh S, Das S (2001) Modulation of DMBA induced genotoxicity in bone marrow by quercetin during skin carcinogenesis. *J Exp Clin Cancer Res* 20:131-134.
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 25:302-305.
- Shulman LM (2007) Gender differences in Parkinson's disease. *Gend Med* 4:8-18.
- Shults CW, Haas RH, Passov D, Beal MF (1997) Coenzyme Q10 levels correlate with the activities of complexes I and II/III in mitochondria from parkinsonian and nonparkinsonian subjects. *Ann Neurol* 42:261-264.
- Siemann EH, Creasy LL (1992) Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am J Enol Vitic* 43:49-52.
- Smith DJ, Ng H, Kluck RM, Nagley P (2008) The mitochondrial gateway to cell death. *IUBMB Life* 60:383-389.
- Smith JV, Luo Y (2003) Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by Ginkgo biloba extract EGb 761. *J Alzheimers Dis* 5:287-300.
- Smith WW, Pei Z, Jiang H, Moore DJ, Liang Y, West AB, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA (2005) Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18676-18681.
- Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM (1997) Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem* 30:91-113.
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M (1998) alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6469-6473.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388:839-840.
- Svennilson E, Torvik A, Lowe R, Leksell L (1960) Treatment of parkinsonism by stereotatic thermolesions in the pallidal region. A clinical evaluation of 81 cases. *Acta Psychiatr Scand* 35:358-377.

- Tabrizi SJ, Orth M, Wilkinson JM, Taanman JW, Warner TT, Cooper JM, Schapira AH (2000) Expression of mutant alpha-synuclein causes increased susceptibility to dopamine toxicity. *Hum Mol Genet* 9:2683-2689.
- Tessitore L, Davit A, Sarotto I, Caderni G (2000) Resveratrol depresses the growth of colorectal aberrant crypt foci by affecting bax and p21(CIP) expression. *Carcinogenesis* 21:1619-1622.
- Thobois S, Guillouet S, Broussolle E (2001) Contributions of PET and SPECT to the understanding of the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neurophysiol Clin* 31:321-340.
- Thomas B, Mohanakumar KP (2004) Melatonin protects against oxidative stress caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the mouse nigrostriatum. *J Pineal Res* 36:25-32.
- Trimmer PA, Swerdlow RH, Parks JK, Keeney P, Bennett JP, Jr., Miller SW, Davis RE, Parker WD, Jr. (2000) Abnormal mitochondrial morphology in sporadic Parkinson's and Alzheimer's disease hybrid cell lines. *Exp Neurol* 162:37-50.
- Tsai SJ, Yin MC (2008) Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells. *J Food Sci* 73:H174-178.
- Tsujimoto Y, Shimizu S (2000) VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ* 7:1174-1181.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160:1-40.
- Van Woert MH, Prasad KN, Borg DC (1967) Spectroscopic studies of substantia nigra pigment in human subjects. *J Neurochem* 14:707-716.
- Vanitallie TB (2008) Parkinson disease: primacy of age as a risk factor for mitochondrial dysfunction. *Metabolism* 57 Suppl 2:S50-55.
- Vegeto E, Benedusi V, Maggi A (2008) Estrogen anti-inflammatory activity in brain: A therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. *Front Neuroendocrinol*.
- Vegeto E, Bonincontro C, Pollio G, Sala A, Viappiani S, Nardi F, Brusadelli A, Viviani B, Ciana P, Maggi A (2001) Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. *J Neurosci* 21:1809-1818.

- Vekrellis K, McCarthy MJ, Watson A, Whitfield J, Rubin LL, Ham J (1997) Bax promotes neuronal cell death and is downregulated during the development of the nervous system. *Development* 124:1239-1249.
- Vila M, Przedborski S (2004) Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat Med* 10 Suppl:S58-62.
- Vila M, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Djaldetti R, Liberatore G, Offen D, Korsmeyer SJ, Przedborski S (2001) Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2837-2842.
- Wakamatsu K, Fujikawa K, Zucca FA, Zecca L, Ito S (2003) The structure of neuromelanin as studied by chemical degradative methods. *J Neurochem* 86:1015-1023.
- Wang X, Dykens JA, Perez E, Liu R, Yang S, Covey DF, Simpkins JW (2006) Neuroprotective effects of 17beta-estradiol and nonfeminizing estrogens against H₂O₂ toxicity in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Mol Pharmacol* 70:395-404.
- Weintraub D, Comella CL, Horn S (2008) Parkinson's disease--Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment. *Am J Manag Care* 14:S40-48.
- Wenzel E, Soldo T, Erbersdobler H, Somoza V (2005) Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats. *Mol Nutr Food Res* 49:482-494.
- Whitton PS (2007) Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol* 150:963-976.
- Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C (2004) Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* 36:838-849.
- Wooten GF, Currie LJ, Bovbjerg VE, Lee JK, Patrie J (2004) Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:637-639.
- Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi DK, Ischiropoulos H, Przedborski S (2002) Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci* 22:1763-1771.

- Wu Y, Shang Y, Sun SG, Liu RG, Yang WQ (2007a) Protective effect of erythropoietin against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurodegeneration in PC12 cells. *Neurosci Bull* 23:156-164.
- Wu Y, Shang Y, Sun S, Liang H, Liu R (2007b) Erythropoietin prevents PC12 cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis via the Akt/GSK-3beta/caspase-3 mediated signaling pathway. *Apoptosis* 12:1365-1375.
- Yanez M, Fraiz N, Cano E, Orallo F (2006) Inhibitory effects of cis- and trans-veratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and on monoamine oxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 344:688-695.
- Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW (2004) Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *Embo J* 23:2369-2380.
- Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y (1996) Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2696-2701.
- Yoshikawa T, Minamiyama Y, Naito Y, Kondo M (1994) Antioxidant properties of bromocriptine, a dopamine agonist. *J Neurochem* 62:1034-1038.
- Youdim MB, Riederer P (1997) Understanding Parkinson's disease. *Sci Am* 276:52-59.
- Yu BP (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74:139-162.
- Yu L, Liao PC (2000) Estrogen and progesterone distinctively modulate methamphetamine-induced dopamine and serotonin depletions in C57BL/6J mice. *J Neural Transm* 107:1139-1147.
- Yuan C-s, Bieber EJ, Bauer BA (2006) Textbook of COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDECINE Informa Healthcare.
- Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 5:863-873.
- Zecca L, Tampellini D, Gerlach M, Riederer P, Fariello RG, Sulzer D (2001) Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. *Mol Pathol* 54:414-418.
- Zhang J, Perry G, Smith MA, Robertson D, Olson SJ, Graham DG, Montine TJ (1999) Parkinson's disease is associated with oxidative damage to

cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *Am J Pathol* 154:1423-1429.

- Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, Wilson B, Zhang W, Zhou Y, Hong JS, Zhang J (2005) Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *Faseb J* 19:533-542.
- Zhao L, Brinton RD (2007) Estrogen receptor alpha and beta differentially regulate intracellular Ca(2+) dynamics leading to ERK phosphorylation and estrogen neuroprotection in hippocampal neurons. *Brain Res* 1172:48-59.
- Zhao Y, Gao Z, Li H, Xu H (2004) Hemin/nitrite/H₂O₂ induces brain homogenate oxidation and nitration: effects of some flavonoids. *Biochim Biophys Acta* 1675:105-112.
- Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F, Muller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK, Gasser T (2004) Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44:601-607.