

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

**COMME EXIGENCE PARTIELLE DE
LA MAITRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE
CELLULAIRE**

**PAR
KEITH CHIASSON**

**ÉTUDE DE L'EFFET DE CERTAINS AGONISTES ET
ANTAGONISTES DE LA DOPAMINE SUR LA TOXICITÉ
INDUITE PAR LA MPP+ ET LE PARAQUAT DANS DES
CELLULES EN CULTURES.**

MARS 2002

2104

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

Pourquoi les neurosciences ? C'est une question qui mérite plus que la simple réponse : "Parce que j'aime ça", quoiqu'elle fasse partie des réponses... Tout d'abord, je crois que toute recherche scientifique se doit d'être faite dans un but humanitaire. Depuis l'aube des temps que l'homme cherche à améliorer sa condition de vie, par l'amour, la guerre et une pléiade d'autres choses. Parmi ces autres choses se situe la science. C'est cette science qui a donné à l'homme de quoi se réchauffer dans la nuit, de quoi transporter le fruit de sa chasse et comment immortaliser ses histoires. Bien plus tard, nous en sommes au point de résoudre ce qui reste comme problèmes pour aider davantage la condition humaine. La science du feu, de la roue et de l'écriture a fait place à la biologie, les mathématiques, la physique, la chimie, l'électronique, et j'en passe... Mon choix de formation en biophysique relève de mes passions, et non seulement de mes intérêts, pour les sciences fondamentales. Par la biophysique je veux être en mesure de comprendre les phénomènes qui sont vraiment à la base de la vie. La poursuite de mes études vers les neurosciences relève aussi de ma passion pour l'être vivant.

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, à qui je dois beaucoup, pour son inspiration, sa persuasion, ses idées, son laboratoire, ses manies et ses habitudes, et bien plus encore... Un laboratoire reflète l'âme de son créateur, et c'est cette âme qui me permet de continuer et d'avancer. Je veux aussi remercier mes collègues de laboratoire: Sylvie (à qui je dois bien du temps...), Bruno, Benoît, Benoît 2 et Meghan. Aussi je tiens à remercier tous mes collègues des laboratoires environnants, qui aident autant par leurs idées de sciences que par toutes leurs autres idées : Alain, Barbara, Maxime, Luc, Karine, Caroline et tous les autres, passés et futurs, qui m'accompagneront pendant le restant de ma formation. Finalement, j'aimerais remercier ma copine Mélissa et surtout mes parents. Sans leur support et leur compréhension, j'aurais passé quelques nuits bien seul dans mon monde... Merci à vous tous !

RÉSUMÉ

La maladie de Parkinson est une dégénérescence du système nerveux central. Cette affection est due à une dégénérescence de près de 80 % des neurones dopaminergiques de la substance noire du mésencéphale. L'étiologie de la maladie de Parkinson n'est pas encore connue. De nombreuses études mettent en cause un stress oxydatif, endogène ou exogène, qui empêcherait la survie des neurones dopaminergiques. Les thérapies actuelles ne sont qu'à caractère symptomatiques, c'est-à-dire elles soignent les symptômes mais ne préviennent pas la dégénérescence déjà profondément amorcée. Toutefois, des recherches cliniques et fondamentales ont montré que certaines molécules pouvaient aider les cellules à survivre, notamment les estrogènes et certains extraits de plantes. Parallèlement, les agonistes dopaminergiques ont longtemps été utilisés comme une thérapie jointe à la levodopathérapie pour en augmenter le potentiel. Une hypothèse courante est que les agonistes dopaminergiques aient aussi un pouvoir préventif sur la dégénérescence neuronale.

Mon projet de maîtrise visait dans un premier temps à vérifier si cette neuroprotection avait lieu et, dans un deuxième temps, à étudier les mécanismes cellulaires pouvant être impliqués. Les résultats obtenus ont démontré que les agonistes n'ont aucun pouvoir neuroprotecteur sur l'induction de la mort cellulaire induite par des toxines reconnues pour cibler les neurones dopaminergiques. Nos résultats suggèrent qu'une des toxines, le MPP+, voit son entrée facilitée par l'ajout d'agonistes de la dopamine. De plus, ce phénomène pourrait être causé par un lien direct entre les récepteurs dopaminergiques et le transporteur de la dopamine. Selon les résultats obtenus, le MPP+ induirait une variation d'expression ou de localisation d'une protéine jouant un rôle dans la recapture de la dopamine. Une autre toxine, le paraquat, semble être recapturée de la même manière que le MPP+. Pris ensemble, tous ces résultats jettent une nouvelle lumière sur les mécanismes cellulaires impliqués dans la survie et dans la mort des cellules responsables de la maladie de Parkinson.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	II
RÉSUMÉ	III
TABLE DES MATIÈRES.....	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	VI
LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IX
CHAPITRE I INTRODUCTION	1
1.1. LA MALADIE DE PARKINSON	1
1.1.1. Aspects Cliniques	1
1.1.2. Neuropathologie	2
1.1.3. Pathophysiologie de la maladie	2
1.2. LES MÉCANISMES IMPLIQUÉS	3
1.2.1. Les récepteurs et les transporteurs de la dopamine	3
1.2.2. Le stress oxydatif	8
1.2.3. Le MPP+	9
1.2.4. Le Paraquat.....	9
1.3. LES THÉRAPIES	9
1.3.1. Thérapies symptomatiques.....	9
1.4. LES NOUVELLES APPROCHES.....	11
1.4.1. Définitions.....	11
1.4.2. Les agonistes de la DA	11
1.4.3. Les antagonistes de la DA.....	12
1.5. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE	13
CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	14
2.1. MATÉRIEL	14

2.2. PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES.....	15
2.2.1. Culture cellulaire de PC12	15
2.2.2. Différenciation cellulaire	15
2.2.3. Traitement des cultures	17
2.2.4. Induction du stress oxydatif	17
2.2.5. Mesure de cytotoxicité.....	17
2.2.6. Gel d'électrophorèse SDS-PAGE.....	21
2.2.7. Immuno-buvardage.....	21
2.2.8. Analyse d'image par informatique	22
2.2.9. Analyses statistiques.....	23
CHAPITRE III RÉSULTATS.....	24
3.1. INTRODUCTION AUX RÉSULTATS	24
3.2. DOSE-RÉPONSE DE L'EFFET DE LA BR CHEZ DES CELLULES DIFFÉRENCIÉES	25
3.3. DOSE-RÉPONSE DE L'EFFET DE LA BR CHEZ DES CELLULES NON-DIFFÉRENCIÉES	27
3.4. EFFET DU BLOQUEUR DU TRANSPORTEUR DE LA DA (GBR)	27
3.5. EFFET DES ANTAGONISTES DE LA DA	29
3.6. CYTOTOXICITÉ INDUITE PAR D'AUTRES AGENTS STRESSANTS	29
3.7. RÉSULTATS SDS-PAGE / IMMUNO-BUVARDAGE ET ANALYSES D'IMAGES.....	32
3.8. DOSAGE DE LA DA	32
3.9. RÉSUMÉ DES RÉSULTATS	35
CHAPITRE IV DISCUSSION ET CONCLUSION.....	36
4.1. MÉCANISME APPARENT DE LA MORT CELLULAIRE.....	36
4.2. CONCLUSIONS	40
BIBLIOGRAPHIE.....	43

LISTE DES TABLEAUX

A1	Propriétés des substances utilisées.....	41
----	--	----

LISTE DES FIGURES

1.1	Schéma d'un récepteur couplé aux protéines G	5
1.2	Séquence d'activation entre le neurotransmetteur et la protéine effectrice	6
2.1	Photographie en microscopie optique des cellules PC12 avant et après traitement au NGF	16
2.2	Exemple de configuration d'une plaque de 96 puits.....	18
2.3	Résultats de la dose-réponse du MPP+ sur des cellules différenciées et non-différenciées	19
2.4	Résultats de la dose-réponse du PQ sur des cellules différenciées et non-différenciées	19
2.5	Figure illustrant le principe du dosage de la cytotoxicité par mesure spectrophotométrique.....	20
3.1	Dose-réponse de la Br contre la cytotoxicité induite par le MPP+ pour des cellules différenciées.....	26
3.2	Dose-réponse de la Br contre la cytotoxicité induite par le PQ pour des cellules différenciées.....	26
3.3	Dose-réponse de la Br contre la cytotoxicité induite par le MPP+ pour des cellules non-différenciées.....	28
3.4	Dose-réponse du Qp contre la cytotoxicité induite par le MPP+ pour des cellules non-différenciées.....	28
3.5	Effet du GBR dans la dose-réponse de la Br contre la cytotoxicité induite par le MPP+ pour des cellules non-différenciées.	30
3.6	Effet du GBR dans la dose-réponse de la Br contre la cytotoxicité induite par le PQ pour des cellules non-différenciées.	30
3.7	Effet du Sul dans la dose-réponse de la Br contre la cytotoxicité induite par le MPP+ pour des cellules non-différenciées.....	31
3.8	Effet du Spi dans la dose-réponse de la Br contre la cytotoxicité induite par le MPP+ pour des cellules non-différenciées.....	31

3.9	Comparatif de l'effet de la Br contre la cytotoxicité induite par le PQ et par le H_2O_2 pour des cellules non-différenciées.	33
3.10	Comparatif de l'effet de la Br contre la cytotoxicité induite par le PQ et par le $FeSO_4 + H_2O_2$ pour des cellules non-différenciées:	33
3.11	Résultats d'analyses des immuno-buvarpages dirigés contre la tyrosine hydroxylase (TH).....	34
3.12	Résultats d'analyses des immuno-buvarpages dirigés contre le transporteur de la dopamine (DAT)	34
A1	Images des molécules utilisées dans le cadre de nos expériences	41
A2	Schéma des voies métaboliques de la dopamine	42

LISTE DES ABRÉVIATIONS

6-OHDA :	6-hydroxydopamine
AMPC :	Adénosine mono-phosphate cyclique
ATP :	Adénosine tri-phosphate
Br :	Bromocriptine, (2-bromo-alpha-ergocryptine methanesulfonate salt)
BHE :	Barrière hémato-encéphalique
BSA :	Albumine bovine sérique
COMT :	Catechol-O-methyl transferase
DA :	Dopamine ou dopaminergique
DAT :	Transporteur de la dopamine
EDTA :	Acide éthylènediaminetétraacétique
FBS :	Sérum fœtal bovin
GBR :	GBR12909
GTP :	Guanosine tri-phosphate
HC :	Contrôle maximal (high control)
HPLC-ED :	Chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur électrochimique
HS :	Sérum de cheval
L-DOPA :	L-3,4-Dihydroxyphenylalanine
LC :	Contrôle minimal (low control)
LDH :	Lactate déshydrogénase
MAO :	Monoamine oxydase
MP :	Maladie de Parkinson
MPP+ :	1-Methyl-4-phenylpyridinium iodé
MPTP :	1-Methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine
NGF :	Facteur de croissance du nerf
NMDA :	N-methyl-D-aspartate
PBS :	Solution tampon phosphate
PQ :	Paraquat
PVDF :	Polyvinylidène difluoride
ROS :	Radicaux d'oxygène réactif
Qp :	Quinpirole hydrochloride
SDS-PAGE :	Électrophorèse sur gel de poly-acrylamide avec sodium dodécylsulfate
Spi :	Spiperone, N-methyl-spiperone hydrochloride
Sul :	Sulpiride
TBS :	Solution tampon tris
TEMED :	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TH :	Tyrosine hydroxylase

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1. La maladie de Parkinson

1.1.1. Aspects Cliniques

La maladie de Parkinson (MP) est une affection du système nerveux central. Cette maladie à caractère dégénératif touche une population âgée en moyenne de 65 ans. Chez les 50 ans et plus, la fréquence d'apparition de la maladie est près de 1 personne sur 100. L'évolution de cette maladie est longue, car le temps entre l'apparition des premiers symptômes caractéristiques et de l'incapacité complète du patient peut être de 5 à 20 ans (1). Le trait caractéristique de la MP est l'hypokinésie, c'est-à-dire une réduction considérable de la capacité à réaliser un mouvement. Les symptômes moteurs sont typiquement de trois ordres : la difficulté à initier un mouvement volontaire (akinésie), la lenteur du mouvement (bradykinésie) et l'augmentation du tonus musculaire (rigidité). Cette triade de signes est souvent accompagnée d'un tremblement au repos et d'une perte des réflexes naturels. L'évolution lente, ainsi que divers tests pratiques en clinique, permettent de soutenir le diagnostic de la maladie (pour une revue, voir la réf. (2)).

La série de symptômes aide au diagnostic clinique de la maladie. Par contre, d'autres maladies ont les mêmes symptômes. Il y a plusieurs années, on assumait qu'une des maladies vasculaires cérébrales pouvait mener à ce type de manifestations de la MP, d'où l'appellation clinique de Parkinsonisme Artériosclérotique (3). Cette hypothèse fut initialement rejetée, mais elle est maintenant admise comme plausible. Les autres maladies avec des manifestations extrapyramidales ressemblant à la MP incluent le syndrome de Shy-Drager et l'atrophie olivopontocérébelleuse (4-7). La MP est souvent accompagnée par des symptômes psychologiques, comme la dépression et/ou la démence (8).

1.1.2. Neuropathologie

Un des traits caractéristiques de la MP est sans aucun doute la présence d'inclusions intracellulaires appelées Corps de Lewy (CL). Ces inclusions apparaissent principalement dans les neurones dopaminergiques de la substance noire (partie compacte) du mésencéphale. Il est important de noter que seuls les neurones DA projetant *vers* le putamen sont affectés par la dégénérescence neuronale. Le CL est un agrégat non-structuré de protéines partiellement dégradées, de lipides oxydés et de fragments de vésicules de transport. L'hypothèse actuelle de la formation des CL implique la mutation d'une protéine membranaire, l'alpha-synucléine, qui deviendrait spontanément sous forme agrégée (9). Cette protéine mutée se retrouve dans les deux formes de la maladie, soit la forme familiale (5% des cas de MP) et la forme sporadique (95% des cas de MP). Le mécanisme de cette mutation n'est toutefois pas encore élucidé, mais le stress oxydatif semble de plus en plus être à l'origine de cette agrégation (10, 11).

Des analyses ont montré qu'il y a une diminution progressive du niveau de DA dans le striatum. C'est lorsque le niveau descend de 30% de sa valeur initiale que les premiers symptômes cliniques apparaissent.

1.1.3. Pathophysiologie de la maladie

Bien entendu, il n'existe pas de mécanisme consensus de la MP. Bien des théories reposent sur le fait que seule une population cible de neurones (DA) est atteinte. Ce qui permet de croire à un phénomène de ciblage spécifique par des toxines, comme des expériences le démontrent. Par exemple, l'utilisation de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) marquée, un analogue de la DA, permet de voir cette molécule captée et transportée par le transporteur de la dopamine (DAT) vers l'intérieur de la cellule. Il en résulte une accumulation intraneuronale de composés toxiques. Cette augmentation est responsable de la dégénérescence des neurones catécholaminergiques qui s'ensuit (12). Toutefois, la 6-OHDA ne peut traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE), elle n'est donc pas la cause de la MP comme toxine exogène (13).

Dans les années '80, de jeunes adultes, apparemment en bonne santé, voulaient augmenter les effets de leur consommation d'opium en ingérant un dérivé du mépéridine fabriqué par un chimiste amateur. Inconsciemment, ils ont absorbé du 1-Méthyl-4-phényl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP), et ils ont développé des symptômes similaires à la MP idiopathique. Bien malgré eux, cette situation a permis de cibler une nouvelle avenue pour l'étiologie et le traitement de la MP. Depuis, le mécanisme de toxicité du MPTP a été étudié à fond. De plus, l'administration du MPTP à des singes et à des rongeurs nous fourni le seul modèle animal de la MP (14-18). Ces observations ont permis d'établir un lien entre le stress oxydatif et la pathogenèse de la MP.

Évidemment, il existe d'autres sources possibles qui peuvent causer des dommages irréversibles aux neurones DA. Un excès d'acide aminé, particulièrement le glutamate, est une voie grandement explorée dans la recherche (19). L'importance du glutamate est justifiée par la présence d'une forte afférence glutamatergique vers le corps strié et vers la substance noire. La toxicité est induite par la suractivation des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) qui sont responsable de l'échange sodium-potassium, mais surtout de l'entrée de calcium dans le milieu intracellulaire. Comme il y existe énormément de cascades d'enzymes qui sont modulées par le taux de calcium, l'entrée massive de calcium induit un stress dépassant le seuil tolérable de cellule. Des tests ont montré que les processus dégénératifs causés par le glutamate peuvent être renversés par l'ajout d'antagonistes du récepteur NMDA dans le milieu de culture. Par exemple, des résultats préliminaires ont montré qu'un traitement à la memantine, un antagoniste NMDA, pourrait ralentir le processus de dégénération neuronale (20).

1.2. Les mécanismes impliqués

1.2.1. Les récepteurs et les transporteurs de la dopamine

C'est à Keabian et Calne, en 1979, qu'on doit la découverte que la dopamine (DA) se lie à 2 types de récepteurs, nommé D₁ et D₂. Ces deux types de récepteurs se différencient aux niveaux pharmacologique, biochimique, physiologique et par leur

distribution anatomique (pour une revue, voir (21)). Ces deux récepteurs ont été par la suite accompagnés par d'autres récepteurs de la DA qui furent découverts bien plus tard. On dénombre actuellement 5 sous-types de récepteurs dopaminergiques, nommés D₁ à D₅. Les récepteurs sont regroupés en 2 classes fonctionnelles appelées « D₁-like » et les « D₂-like ». Le collectif D₁ comprend 2 formes structurales, soit D₁ et D₅. Le collectif D₂ quant à lui regroupe 3 formes du récepteur D₂, soit D₂, D₃ et D₄. Les récepteurs dopaminergiques sont des récepteurs couplés à une protéine G. Les récepteurs sont formés d'une seule sous-unité protéique qui présente 7 domaines hydrophobes transmembranaires en hélice- α . La partie N-terminale de la protéine est extracellulaire et la partie C-terminale est intracellulaire (voir la figure 1.1). Dans le cas des récepteurs dopaminergiques, l'activation des protéines G est responsable de la modulation de l'activité d'une autre protéine transmembranaire, l'adénylate cyclase. Cette dernière transforme l'ATP en AMPc, ce dernier étant un second messager servant entre autre à l'activation de différents enzymes intracellulaires (voir figure 1.2).

Une multitude de cascades enzymatiques dépendent de cet AMPc pour s'activer, notamment une série de kinases AMPc-dépendant. Les kinases serviront à leur tour à phosphoryler des protéines pour les rendre actives ou inactives, selon le besoin spécifique de la cellule. L'aspect le plus important des 2 classes de récepteurs est leur fonction opposée. Les récepteurs D₁-like interagissent avec le complexe G_s pour activer l'adénylate cyclase, alors que les D₂-like interagissent avec le complexe G_i pour inhiber l'adénylate cyclase. Il est donc capital de comprendre les fonctions associées aux deux classes de récepteurs DA puisque les modulations positives ou négatives qu'ils exercent s'avèrent d'une très grande importance dans le cadre de nos recherches.

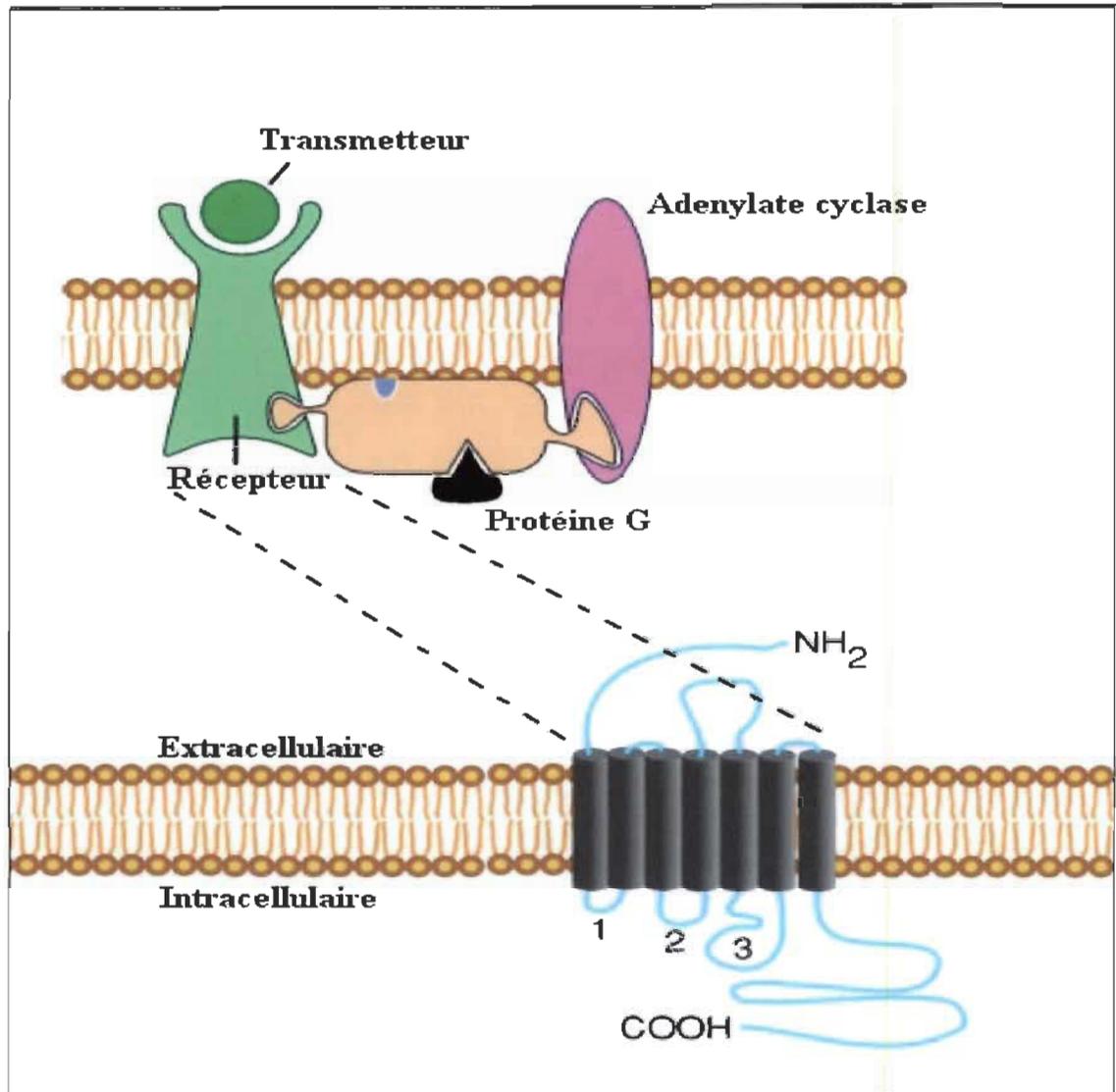
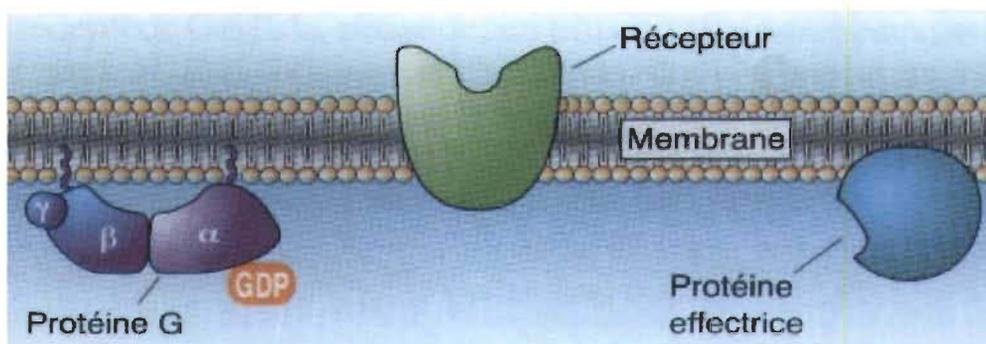
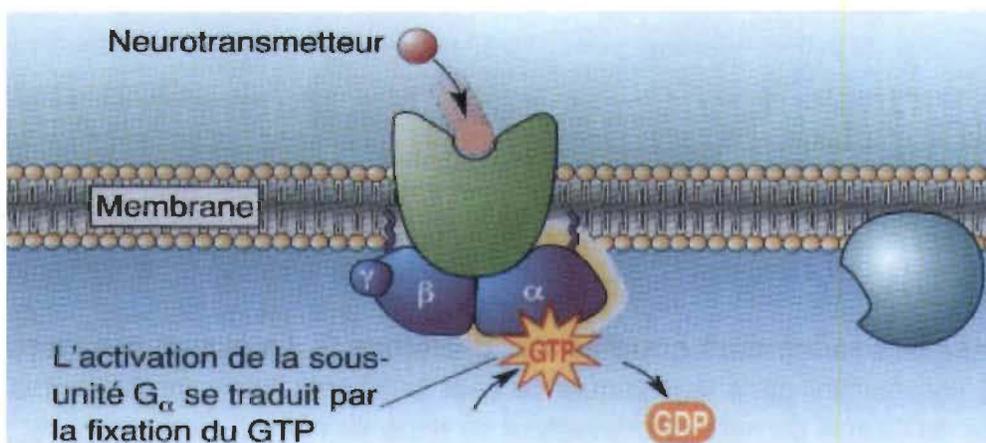


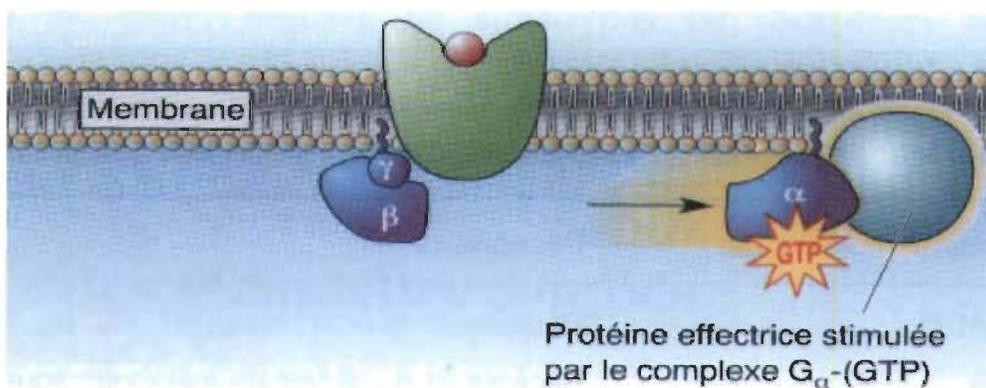
Figure 1.1 : Schéma d'un récepteur couplé à une protéine G. La partie supérieure de la figure montre le récepteur accompagné des autres éléments responsables de la signalisation. La partie inférieure montre les 7 hélices transmembranaires qui composent le récepteur. Noter la présence de la troisième boucle intracellulaire (nommée 3 sur la figure) qui est responsable de la liaison récepteur-protéine G. (Adaptation française de : Zigmond, *Fundamental Neurosciences*, Academic Press, 1999, p. 236)



(a)



(b)



(c)

Figure 1.2 : Séquence d'événement impliquant l'activation d'un récepteur métabotrope jusqu'à la protéine cible. (a) Les éléments impliqués dans cette signalisation. (b) La liaison du neurotransmetteur avec le récepteur fait lier la protéine G au récepteur. La sous-unité α est ensuite activée par la liaison du GTP. (c) la sous-unité α est libérée du complexe initial puis elle est reconnue par la protéine effectrice. Cette dernière effectue donc sa tâche prescrite. (source : Bear, *Neurosciences*, Éditions Pradel, 1997, p.144)

Un élément qui joue un rôle important dans la concentration de DA extracellulaire est le transporteur de la dopamine (DAT). Ce dernier est une protéine transmembranaire de la famille des transporteurs à haute affinité, Na^+ -dépendant et spécifique à son substrat (22). La recapture de la DA par le DAT constitue l'un des processus clés pouvant influencer la durée, la localisation et l'amplitude de l'effet de la DA sur ses récepteurs.

Les recherches sur la cinétique du DAT ont montré que, de façon générale, le transporteur lie dans l'ordre : 1 ou 2 Na^+ , un Cl^- et une DA pour en effectuer le transport. Ce qui rend le transport de la DA un processus électrogène, qui peut être modulé par tout ce qui module la différence de potentiel entre les 2 faces de la membrane cellulaire. De plus, des études ont montré que l'activité du DAT dépend de la liaison voltage-dépendante du sodium pour que le reste du transport soit effectué (23). La phase de dépolarisation rend le transporteur inactif, alors que l'hyperpolarisation de la membrane augmente la liaison du Na^+ sur le transporteur, le rendant plus actif pendant cette phase, ce qui correspond bien avec le mécanisme d'exocytose de neurotransmetteurs dans la fente synaptique (23). Globalement, l'inhibition de l'activité du DAT permet d'avoir une quantité maximale de DA disponible pendant la dépolarisation tandis que son activation pendant l'hyperpolarisation élimine toute trace de DA dans la fente synaptique. Considérant le taux plutôt lent de recapture (moins de 10 cycles/sec), la contribution du transport de la DA dans la régulation de la transmission de DA dépend donc du flux net de DA, de la densité locale de DAT et de l'affinité des différents récepteurs DA pour la DA présente dans la fente synaptique.

Parmi les dernières découvertes sur les différents types de récepteurs DA et le DAT, certains mécanismes ont été proposés pour relier plus étroitement ceux-ci. Le récepteur D_2 , habituellement sur l'élément pré-synaptique de la synapse, sert plutôt d'autorécepteur pour la régulation du message envoyé vers l'élément post-synaptique. La fonction du D_2 étant d'inhiber la production d'AMPc, il en découle une inhibition de l'activité de la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme impliquée dans la synthèse de DA. De plus, il semble que le récepteur D_2 exerce une influence sur le temps de demi-vie du

DAT, car il a été montré que l'ajout d'agonistes D_2 augmente la durée de demi-vie du DAT dans des cellules provenant du noyau accumbens et du striatum, et que l'ajout d'un antagoniste D_2 bloque cet effet (24). Il a aussi été mis en évidence que l'activation D_2 augmente la quantité active de DAT à la surface de la membrane. Toutefois, on ne peut expliquer si le phénomène se manifeste sous forme d'expression accrue du DAT ou simplement par une translocation intra/surface de la cellule. Cette manifestation montre simplement que la recapture est amplifiée via une plus grande quantité de DAT à la surface (25). D'autres études ont montré toutefois que l'activation des récepteurs D_2 ne venait pas influencer l'affinité du DAT pour son ligand, alors seulement sa densité locale membranaire peut influencer la recapture de la DA (26). Finalement, Pristupa *et coll.* ont montré que la translocation du DAT peut être médié indirectement par l'AMPC, car ce dernier module l'activité de protéines kinase (PKA et PKC) de façon à favoriser la translocation vers la surface cellulaire, ce qui est en accord avec la conclusion initialement proposée par Kadowaki *et coll.* (27, 28)

1.2.2. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est souvent un produit de la respiration cellulaire, de l'action des xénobiotiques, des radiations ou d'autres toxines chimiques. Ces sources oxydantes, accompagnées par des enzymes au pouvoir oxydant et aux catalyses médié par des métaux de transition, produisent des réactions qui donnent lieu à différentes espèces radicalaires ($\bullet\text{OH}$, O_2^- , H_2O_2 , O_3 , etc). Ces molécules très réactives sont parfois utiles pour la défense immunitaire, mais elles peuvent rendre le milieu cellulaire corrompu par leur réactivité non-spécifique dirigée contre des éléments vitaux de la cellule. Les éléments du cytosquelette, les protéines de soutien, de transcription, de traduction, les lipides membranaires et autres peuvent être atteints plus ou moins sévèrement par les réactions oxydatives et occasionner un dérèglement létal des fonctions cellulaire. Après un stress oxydatif trop important, la cellule périt rapidement et provoque la mort des cellules environnantes. Dans le cas de la MP, les observations neuropathologiques ont reporté une variation des éléments oxydants, i.e. hausse du Ca^{++} , du H_2O_2 , de la peroxydation des lipides, et une diminution des mécanismes de défenses : glutathion peroxydase et superoxide dismutase.

1.2.3. Le MPP+

Tel qu'expliqué dans la section 1.1.3, le MPTP a été découvert fortuitement par des consommateurs de drogues illicites dans les années 1980 (29). Ce n'est pas le MPTP qui est toxique mais bien le produit de réaction du MPTP avec la monoamine oxydase B (MAO-B), nommé l'ion 1-Méthyl-4-phenylpyridinium (MPP+) (annexe A1). Cet ion est réputé pour inhiber la réaction du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. La spécificité du MPP+ à attaquer la voie dopaminergique a été démontrée, mais certains mécanismes sont encore à élucider (30). Parmi ceux que nous connaissons, le mode de recapture du MPP+ dans la cellule est le même que celui de la DA, i.e. par le DAT (31-34). Cet ion aussi est connu pour conduire les mitochondries vers une déplétion d'ATP, une génération d'espèces oxydantes réactives (ROS) et au déséquilibre de l'homéostasie du Ca^{2+} (35).

1.2.4. Le Paraquat

Le paraquat (PQ, annexe A1) est un herbicide non-spécifique utilisé encore aujourd'hui dans les champs de maïs. Des études épidémiologiques ont mis en évidence un taux plus élevé de cas de MP dans les régions rurales où le PQ a été utilisé (36-38). Cette molécule possède une structure analogue au MPP+, d'où son intérêt dans nos recherches. Les mécanismes de toxicité de cette molécule oxydante restent encore obscurs, mais diverses équipes de recherches stipulent que le PQ oeuvrerait par réaction oxydative comme le MPP+. De plus, des études ont montrées que le PQ induit une forte peroxidation lipidique. Ce mode de fonctionnement du PQ pour induire l'apoptose des cellules ne fait toutefois pas consensus (39-43). L'intérêt d'utiliser cette molécule est de comparer ses effets avec ceux du MPP+.

1.3. Les thérapies

1.3.1. Thérapies symptomatiques

La thérapie anti-parkinsonienne la plus répandue se base sur l'ingestion par le patient de L-DOPA, qui est le précurseur direct de la DA. En effet, la DA ne passe pas la BHE, tandis que la L-DOPA passe cette barrière. En permettant au système nerveux

du patient d'avoir une source exogène de dopamine, les symptômes de la MP sont grandement atténués. C'est à partir de ce traitement que le diagnostic de la MP se précise puis permet d'éliminer le diagnostic pour les autres maladies à caractère neurodégénératif. L'administration de L-DOPA est encore grandement utilisée dans le monde, bien que certains chercheurs croient que ce traitement ne fait qu'accélérer le processus de dégénération cellulaire (44-46).

D'autres traitements ont vu le jour depuis une dizaine d'années. Le traitement aux anti-cholinergiques, qui a comme mécanisme de réduire l'hyperactivité des neurones Ach du striatum. Malheureusement, le traitement est mal toléré car les trop nombreux effets secondaires reliés aux anti-cholinergiques rendent la vie des patients difficile. Un autre traitement envisagé utilise les inhibiteurs de la MAO et de la cathécol-O-methyl transférase (COMT). Ce traitement sert essentiellement à freiner la perte de la DA en inhibant les enzymes responsables de sa dégradation (annexe A2).

Des recherches intensives se font sur le développement d'une méthode d'intervention chirurgicale depuis près de 5 ans. Cette méthode consiste à greffer des cellules qui pourraient exprimer le phénotype dopaminergique, dans le striatum, afin d'apporter de la DA directement sur les récepteurs. Bien que des tests préliminaires aient été faits avec des transplantations de tissus dopaminergiques dans les noyaux caudé et putamen, les résultats sont peu satisfaisants. L'utilisation de cellules souches reste la voie la plus prometteuse : elle emploie des cellules souches embryonnaires qui sont différenciées en neurones DA *in vitro* et ensuite transplantées dans les régions lésées des patients atteints de la MP. Mais cette technique n'est pas encore assez développée pour permettre une évaluation critique (47-53).

Une approche thérapeutique utilisée parallèlement à la levodopathérapie est celle employant des agonistes des récepteurs DA. Bromocriptine, apomorphine, pergoline et lisuride ont déjà fait leurs preuves en clinique. De nouveaux agents comme le ropinirole ou la cabergoline ont montré des avantages, principalement au niveau de la durée de demi-vie et des effets secondaires, sur les moins récentes thérapies d'agonistes.

1.4. Les nouvelles approches

1.4.1. Définitions

Un agoniste est une molécule qui se lie à un site spécifique sur un récepteur et active ce dernier de façon telle que le récepteur produise son effet physiologique.

Un antagoniste est une molécule qui se lie au même site spécifique sur un récepteur et, en empêchant la liaison d'une autre molécule sur le récepteur, empêche l'activation du récepteur et son mécanisme physiologique.

Un agoniste inverse est une forme d'antagoniste qui se lie sur un récepteur et le force à produire son effet dans le sens complètement opposé.

Par exemple, une pompe à ion mobilise les ions dans un sens lorsqu'elle est activée par un agoniste, arrête son activité par la liaison d'un antagoniste, et mobilise les ions dans l'autre sens par la liaison d'un agoniste inverse.

1.4.2. Les agonistes de la DA

La découverte des agonistes de la DA s'est avérée une étape importante dans le traitement de la MP. Sur le plan physiologique, l'utilisation des agonistes DA fournit le stimulus nécessaire au bon fonctionnement des boucles motrices. De plus, les agonistes ne sont pas dégradés par les mêmes mécanismes que la DA, d'où leur effet prolongé. Finalement, les agonistes ne peuvent s'auto-oxydés comme la DA, réduisant ainsi le stress oxydatif. Les agonistes ont aussi la propriété de ne pas être catalysés, transportés et traités de la même façon que l'est la DA.

Le mécanisme d'action des agonistes est relativement simple. Les agonistes en solution se lient avec les récepteurs D₂ des cellules, activant ces derniers comme la DA le fait. La séquence de liaison est similaire aux autres récepteurs métabotropiques (voir section 1.2.1, la figure 1.1 et 1.2).

Il existe deux classes d'agonistes DA : Les ergopeptines et les non-ergopeptines. La première classe d'agonistes comprend principalement les alcaloïdes de l'ergot de

seigle. Bromocriptine, pergolide et cabergoline en sont les principaux constituants. Les effets sont efficaces mais leur manque de spécificité amène plusieurs effets secondaires importants : vasospasmes, oedème des membres inférieurs, fibrose pulmonaire ou rétropéritonale, etc. (54). La seconde classe d'agonistes comprend l'apomorphine, le ropinirole et le pramipexole. Ces composés ont été synthétisés à partir d'études tridimensionnelles des récepteurs D_2 pour créer des composés plus spécifiques et plus efficaces que ceux de la première classe. Ils ont donc moins d'effets secondaires, mais certains effets restent propres à l'utilisation d'agonistes DA, confusion et hallucinations, par exemple.

Les agonistes de la DA restent une voie de traitement coopérative avec la L-DOPA, car leur potentiel est moindre que la L-DOPA et leurs effets moins efficaces. L'utilisation des agonistes est donc principalement sous forme de bithérapie, sauf dans les phases très précoces de la manifestation de la maladie de Parkinson.

1.4.3. Les antagonistes de la DA

Les antagonistes de la DA ne sont pas utilisés comme traitement de la MP. Par contre, ils sont souvent utilisés dans le cadre de traitement pour d'autres maladies telle que la schizophrénie. En fait, la plupart des neuroleptiques sont des antagonistes de la DA.

Le mécanisme d'action de l'antagoniste est simple. Il se lie au récepteur DA et le bloque réversiblement dans sa forme inactive, l'empêchant de se lier intracellulairement avec une protéine G. Dans le cadre de nos expériences, les antagonistes utilisés servent à bloquer les sites de la DA sur les récepteurs D_2 . La liaison de l'antagoniste sur le récepteur D_2 empêche l'activation de ce récepteur, donc il n'y a pas de diminution de la teneur intracellulaire d'AMPc. Il est important de retenir que le fait de bloquer le D_2 n'a pas le même résultat que d'activer le récepteur D_1 , qui exerce une fonction opposée. Le niveau intracellulaire d'AMPc n'est simplement plus influencé par le D_2 .

1.5. Objectifs et hypothèses de recherche

L'objectif principal de mon projet de maîtrise était de mettre en évidence le pouvoir neuroprotecteur des agonistes DA envers le stress oxydatif induit *in vitro*. Cette démarche de recherche a pris naissance de l'observation que les agonistes DA semblent être utilisés de plus en plus en thérapie clinique comme nouveau « médicament miracle ». Par contre, il n'existe pas d'études sur leur efficacité à long terme et peu d'études ont été menées à propos du mécanisme cellulaire sous-jacent. De plus, ils sont administrés conjointement ou non avec la L-DOPA thérapie, selon 2 écoles thérapeutiques différentes. Nous avons voulu étudier, sur un modèle de MP en culture cellulaire, les effets de ces agonistes DA sur le stress oxydatif qui est aujourd'hui considéré la cause la plus probable du vieillissement et de la mort des neurones, en particulier des neurones DA. Pour ce faire, nous avons utilisé et validé un modèle de culture cellulaire. Les PC12, qui sécrètent toutes les catécholamines et qui, lors de la différenciation en phénotype neuronal sécrètent seulement de la DA.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Une description détaillée des produits utilisés en laboratoire, ainsi que les méthodes utilisées, sera faite dans cette section. Il sera question de la technique de culture cellulaire, le traitement de ces cultures et la mesure de la cytotoxicité, ou mesure de la mort cellulaire. De plus, la section comprendra la méthode de séparation de protéines sur gels d'acrylamide, l'immuno-buvardage de cette séparation et finalement la mesure semi-quantitative par analyse d'image électronique.

2.1. Matériel

Les cellules utilisées pour toutes les expériences sont des cellules provenant des phéochromocytomes de la médullosurrénale de rat, ou PC12, provenant de la compagnie ATCC (Rockville, Maryland). Ces cellules sont cultivées dans du milieu RPMI 1640, avec 5 % sérum fœtal bovin (FBS) et 10 % Sérum de Cheval (HS), le tout venant de chez GibcoBRL. Ce milieu sera appelé dorénavant RPMI 15%. Le facteur de croissance du nerf (NGF), l'albumine sérique de bœuf (BSA), la bromocriptine (Br), le spiperone (Spi), le GBR12909 (GBR) et le paraquat (PQ) proviennent de chez Sigma (Ontario, Canada), ainsi que le MPP+, le quinpirole (Qp) et le sulpiride (Sul). Le kit de dosage de cytotoxicité par la lactate déshydrogénase (LDH) provient de Roche Diagnostics (Québec, Canada). Le TEMED, le persulfate d'ammonium, le bleu de coomassie, l'acrylamide, la membrane de PVDF et les standards de poids moléculaires proviennent de chez Bio-Rad (Ontario, Canada). Le Tri-Reagent utilisé pour les extractions des protéines provient de chez Sigma. Les anticorps primaires et secondaires ainsi que les réactifs pour la détection des immuno-buvardages par chimiluminescence ont été achetés chez Boehringer Mannheim (Roche Diagnostics). Le logiciel d'analyse d'image (Kodak 1D Image Analysis Software), la caméra numérique (DC120) ainsi que son support ont été achetés chez Mandel (Québec, Canada).

2.2. Procédures expérimentales

2.2.1. Culture cellulaire de PC12

Les cellules sont cultivées dans un incubateur à saturation d'eau (Forma Scientific), à 37°C et 5% CO₂. Toutes les étapes décrites dans la présente section, ainsi que dans la prochaine, se font sous une hotte stérile BioKlone2 à flux laminaire. Les PC12 sont déposées sur un pétri (Falcon PRIMaria) à une densité de surface de 45000 cellules/cm². Le milieu RPMI 15% (5% FBS et 10% HS) est changé à tous les 2 jours. Après 8 jours, les cellules sont détachées du pétri avec de la Trypsine-EDTA (0.025%, pH = 7.3) et centrifugées (1 min, 3200 x g) dans un tube. Après 2 lavages, le décompte des cellules se fait sur un hémacytomètre (Fisher Scientific). Une fraction des cellules en suspension est ensuiteensemencée sur un nouveau pétri à la densité de 45000 cell./cm².

Une fois le décompte des cellules effectué, on ensemence les cellules dans des plaques de 96 puits et de 6 puits à la densité respective de 30000 et 100000 cellules/cm². Pour les expériences avec des cellules non-différenciées, les cellules sont gardées dans du milieu RPMI 15%. Les plaques de 96 puits serviront à faire les tests de cytotoxicité, tels qu'expliqués plus loin, et les plaques de 6 puits serviront à l'extraction des protéines totales.

2.2.2. Différenciation cellulaire

Dans le cadre des expériences faites sur des cellules différenciées, les PC12 sont maintenues dans un milieu RPMI contenant 1% de FBS. Pour induire un phénotype neuronal, on ajoute du NGF (50 ng/ml) à chaque changement de milieu, soit à tous les 3 jours. La différenciation dure 12 jours. La figure 2.1 est une photographie qui présente les différences morphologiques entre les cellules différenciées et les cellules non-différenciées.

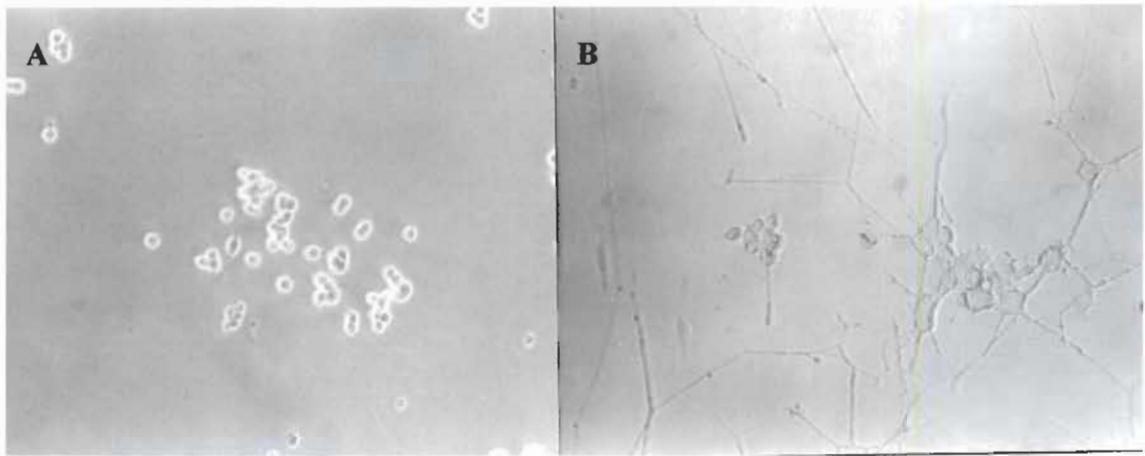


Figure 2.1 : Microscopie optique (grossissement 200X) d'une culture de PC12. A) cellules contrôles ayant eu que du milieu RPMI 15% de sérum. B) cellules après un traitement de NGF (50 ng/ml) pendant 12 jours dans du milieu RPMI 1% de sérum. À noter l'expression du type neuronal par les nombreux prolongement neuritiques et la forme polyédrique du corps cellulaire. De plus, les cellules différenciées contiennent des neurofilaments.

2.2.3. Traitement des cultures

Le traitement des plaques de 96 puits se fait généralement de la même façon pour tous les tests. Les cellules nouvellement ensemencées sont laissées au repos pendant au minimum 48 heures dans le RPMI 15%. Chaque expérience débute par le retrait complet du milieu de culture, puis par l'ajout du nouveau milieu contenant des produits composants chaque condition de traitement. Chaque type de produit est dilué simultanément dans tous les puits de façon à standardiser les temps d'incubation. La figure 2.2 montre des exemples de conditions utilisées dans le cadre d'une expérience.

2.2.4. Induction du stress oxydatif

Le stress oxydatif a été induit en utilisant le MPP+, le PQ, le H₂O₂ et le FeSO₄. Le temps d'incubation de chaque toxine est de 8 heures pour le PQ et de 24 heures le MPP+, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le sulfate ferreux (FeSO₄). La dose-réponse du MPP+ et du PQ a été déterminée selon les expériences de Gélinas et al. (55), telle que montrée à la figure 2.3 et 2.4. Il a été retenu que pour les conditions où les cellules sont différenciées et non-différenciées la concentration du MPP+ sera de 5 mM. Pour le PQ, sa concentration sera de 0.3 mM et 1 mM, respectivement. Aussi, la raison d'utiliser de si grandes concentrations de toxines est clairement expliquée dans la littérature (56, 57).

2.2.5. Mesure de cytotoxicité

La mesure du taux de mort cellulaire est faite à l'aide du kit de mesure de la cytotoxicité (LDH). Tout d'abord, un prélèvement de 100 µl du milieu de culture est utilisé pour chaque condition à l'étude. À ce prélèvement est ajouté 100 µl du mélange enzyme/substrat fourni dans le kit de Roche. La réaction enzymatique (figure 2.5) transforme la solution limpide en solution rougeâtre, dosable à 495 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (Bio-Rad modèle 450). L'arrêt de la réaction de coloration, avant la lecture de la plaque, se fait en ajoutant 30 µl de chlorure d'hydrogène (HCl) 2N. La lecture d'absorbance est ensuite analysée à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Mort Cellulaire (\%)} = \frac{(\text{Abs (x)} - \text{Abs (low)})}{(\text{Abs (high)} - \text{Abs (low)})} * 100\% \quad 2.1$$

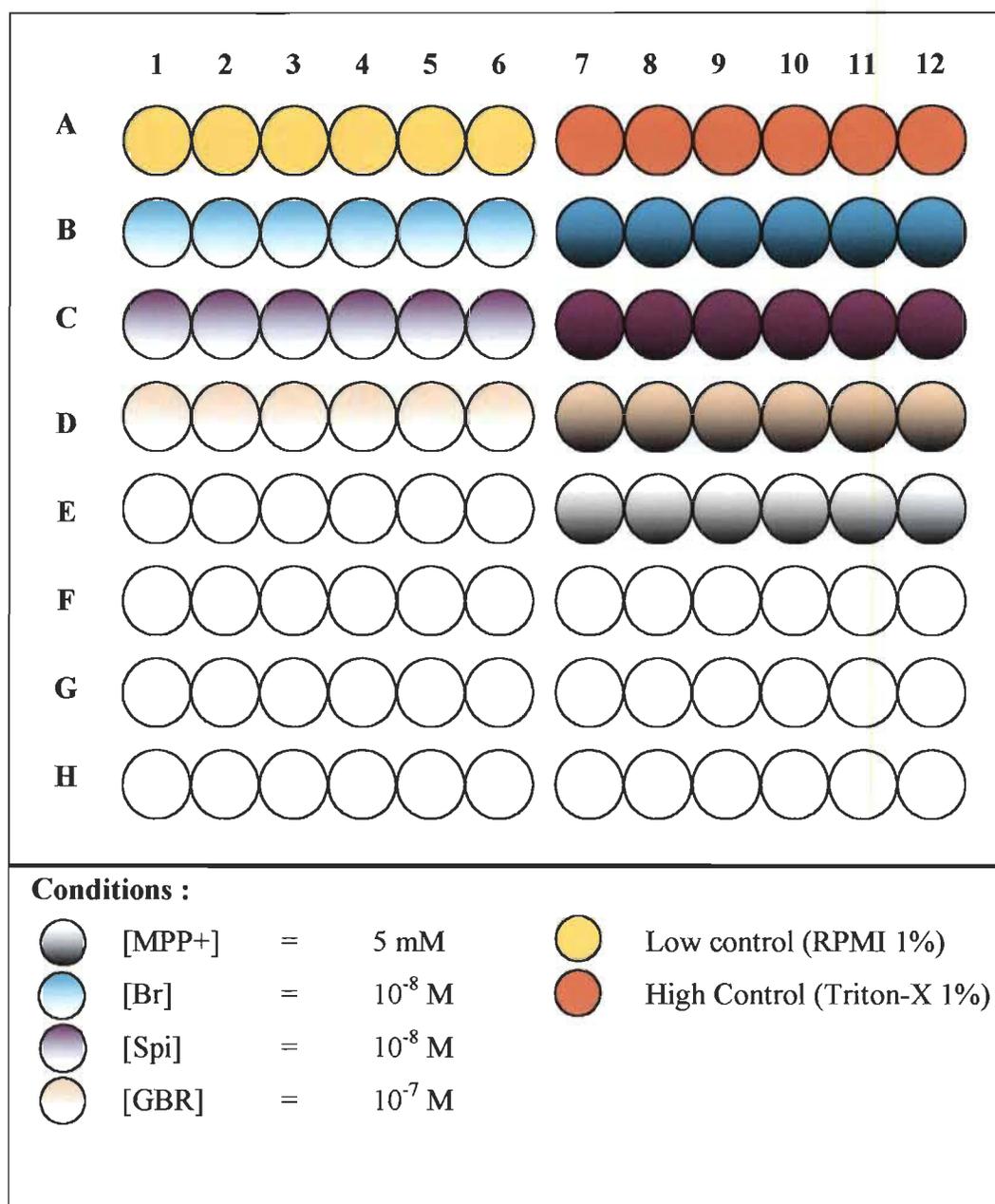


FIGURE 2.2 : Exemple de configuration d'une plaque de 96 puits, illustrant différentes conditions de traitement de la culture cellulaire.

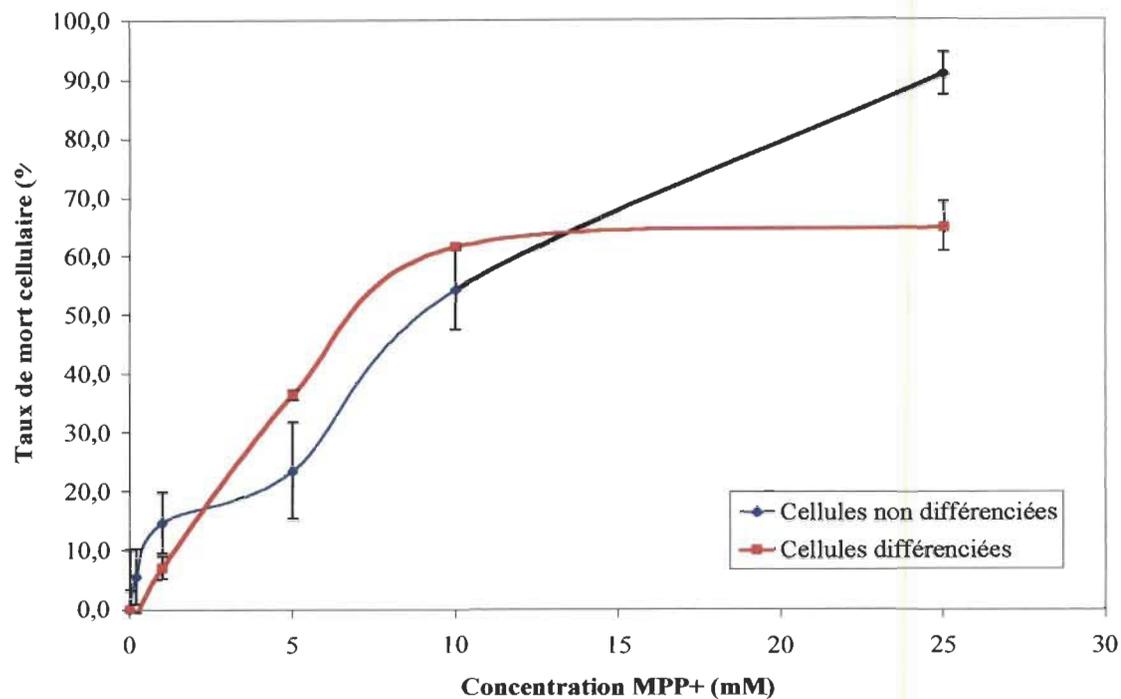


FIGURE 2.3 : La présente figure montre la dose réponse du MPP+ pour les cas où les cellules expriment le phénotype neuronal (en noir) ou pas (en rouge).

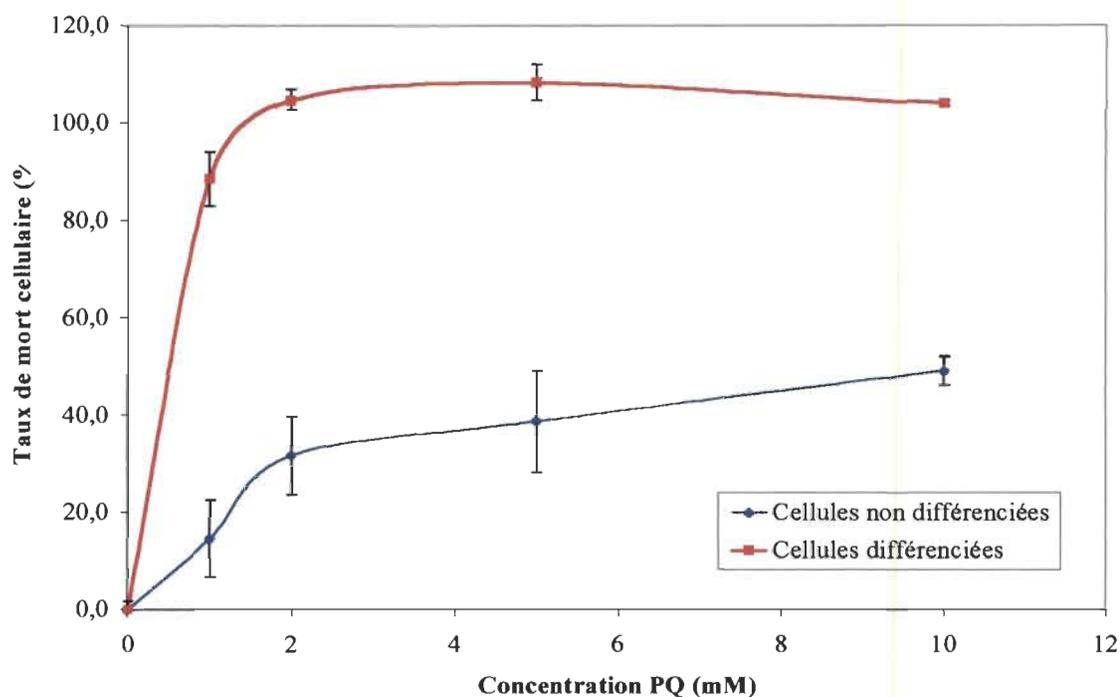


FIGURE 2.4 : La présente figure montre la dose réponse du PQ pour les cas où les cellules expriment le phénotype neuronal (en noir) ou pas (en rouge).

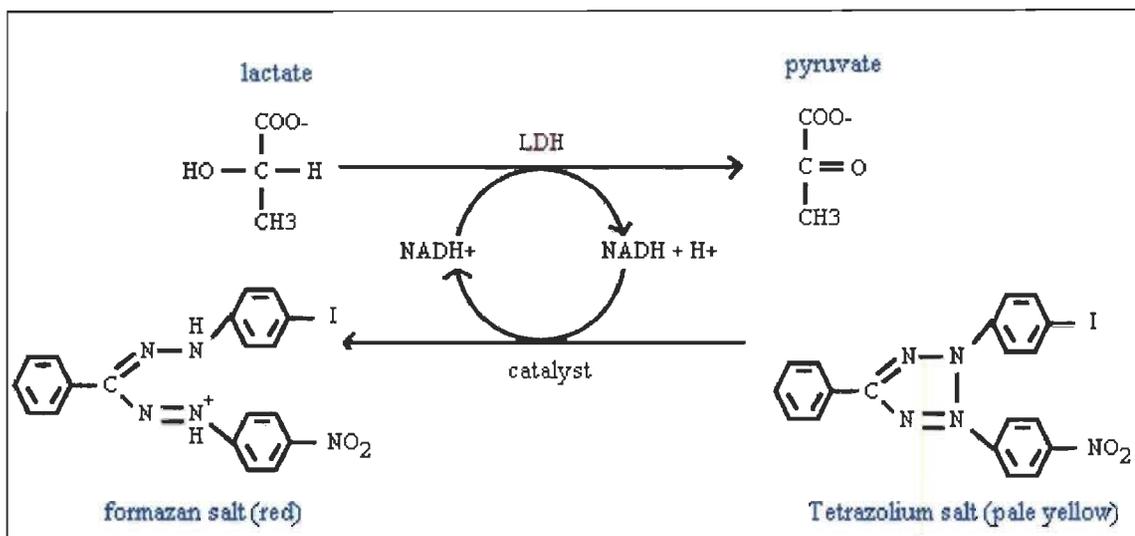


Figure 2.5 : Réaction enzymatique responsable de la coloration, et du dosage spectrophotométrique à 495 nm, du milieu de culture. Cette méthode est une mesure directe de l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase. La mesure de l'activité de la LDH est un indice indirect de la mort cellulaire. Image reproduite du livret d'instruction livré avec le kit de dosage de cytotoxicité de chez Roche Diagnostics.

où $Abs(x)$ est l'absorbance mesurée d'une des conditions de traitement des cellules. Cette mesure est comparée aux valeurs d'absorbance du contrôle minimal (LC) et du contrôle maximal (HC). La raison des contrôles est que des cellules meurent naturellement durant les périodes d'incubation, ce qui a pour effet de hausser le niveau apparent de mort cellulaire. Le LC contient donc le taux de mortalité cellulaire naturel de la période d'incubation, et le HC contient une lyse totale des cellules du milieu de culture, ce qui a pour effet de donner la quantité maximale de cellules pouvant mourir. Le calcul à l'aide de l'équation 2.1 donne le taux de mort cellulaire relatif au maximum de mort en soustrayant la quantité de mort minimale des puits contrôles (niveau basal).

2.2.6. Gel d'électrophorèse SDS-PAGE

Une fois les plaques de 6 puits traitées selon les conditions expliquées plus haut, le surnageant est retiré des puits. Les cellules sont ensuite lysées par l'ajout de Tri-Reagent (1 ml) dans chaque puits. L'extraction des protéines se fait selon le protocole fourni par Sigma (St-Louis). Le dosage des protéines est fait par analyse spectrophotométrique avec le Dye-Reagent de Bio-Rad. La courbe d'étalonnage est faite avec plusieurs concentrations de BSA. Une fois extraites et dosées, les protéines (20 μg /puits) sont déposées sur un gel d'électrophorèse de poly-acrylamide contenant du sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE). Le montage utilisé pour la migration, ainsi que pour l'immuno-buvardage, est le mini Protean II (Bio-Rad). La concentration du gel de migration est de 10 % et celle du gel de compression est de 3 %. L'épaisseur des gels est de 1,5 mm. La migration s'effectue à 200 V pendant 45 minutes. Tous les gels sont faits en double, un servira à l'immuno-buvardage et l'autre sera coloré au bleu de coomassie.

2.2.7. Immuno-buvardage

Le gel est ensuite déposé sur une membrane de PVDF (nylon) puis le tout est inséré dans le montage. Le transfert se fait pendant toute une nuit à 4°C, sous une tension de 25 V. La solution de transfert est composée de Tris-base 50 mM, Glycine 380 mM, SDS 0.1% et de méthanol 20%. La membrane est ensuite déposée dans une solution bloquante (PBS et lait 5%) pendant une heure. Ensuite, on incube sous

constante agitation la membrane avec une solution d'anticorps primaires (dilution 1:1000) et de solution bloquante (TBS pH= 7.3 et 0.5% de bloquant de chez Roche) pendant une heure à température de la pièce. On lave ensuite 4 fois pendant 10 minutes avec une solution de TBS-T (Tris-Base 50 mM, 150 mM NaCl, pH 7.5 et 1% de Tween-20). La membrane est ensuite incubée sous constante agitation avec un anticorps secondaire lié à une peroxydase. L'anticorps est aussi dilué dans une solution bloquante (TBS pH= 7.3 et 0.5% de bloquant de chez Roche). L'incubation dure 30 minutes à température de la pièce. Une autre série de 4 lavages de 10 minutes sépare l'étape de l'anticorps secondaire de l'ajout de la solution finale contenant le substrat chimiluminescent. La membrane est enfin exposée à un film à autoradiographie, puis ce dernier est développé selon les méthodes habituelles de photographie. L'analyse subséquente des bandes de coloration par imagerie numérique et par la quantification logicielle permet de donner une valeur semi-quantitative à l'expression de protéines.

2.2.8. Analyse d'image par informatique

L'analyse des bandes sur les films d'autoradiographie est faite à l'aide d'un système d'analyse d'image de Kodak, le EDAS120. Ce montage inclus un transilluminateur dans le spectre visible et un cône opaque supportant l'appareil photo numérique (DC120). Ce dernier est interfacé à un ordinateur via le logiciel Kodak 1D Image Analysis Software. L'image du film est numérisée puis transférée dans le logiciel. L'analyse de l'image se fait par un calcul Gaussien Symétrique sur chaque bande des films (58). Le logiciel permet la mesure précise de l'intensité des bandes en soustrayant le signal de fond. Le logiciel de Kodak fait un « ajustement » de la courbe Gaussienne par une technique sophistiquée de moindre carré non-linéaire qui a été développée par Levenberg puis qui a été modifiée par Marquardt (59). Le procédé par lequel le logiciel opère pour l'obtention des mesures est le suivant : Il ajuste chaque colonne avec une polynomiale du 5^{ième} degré et il tente une résolution Gaussienne sur chaque bande dans la colonne. Par itérations nombreuses, il réajuste chaque coefficient de la polynomiale de l'arrière-plan (bruit de fond) et les coefficients de chaque Gaussienne afin de minimiser le Chi-Carré de la différence entre le profil modélisé et celui de la colonne. On obtient

les mesures nécessaires pour obtenir les intensités nettes des bandes. Les mesures finales sont ensuite traitées en mesures relatives de contrôles.

Il est donc clair que le dosage « semi-quantitatif » des bandes d'immunobuvardage est d'autant plus significatif que lorsqu'il est couplé au système d'imagerie numérique et d'analyse informatique.

Les résultats présentés dans la section 3.7 sont exprimés en pourcentage du contrôle, où le contrôle correspond au milieu de culture sans traitement. L'équation utilisée pour cette expression en pourcentage de contrôle est la suivante :

$$\text{Pourcentage de contrôle (\%)} = \frac{\sum \text{Int}(x) / n_x}{\sum \text{Int}(x) / n_c} \times 100\% \quad 2.2$$

Ici, il est question d'intensité nette par analyse Gaussienne (i.e. Int(x) et Int(c), pour condition expérimentée et contrôle, respectivement). La valeur des conditions contrôles donne bien entendu 100 %. Les autres conditions sont donc référencées aux valeurs d'intensités de ces contrôles.

2.2.9. Analyses statistiques

Le nombre d'échantillon de chaque condition de traitement se porte à 6, et 3 répétitions de chacun des tests à été fait. Dans la plupart des cas, les données sont présentées par une moyenne \pm SEM. Entre chaque condition expérimentale, d'abord des tests de normalité ont été faits, puis d'égalité des variances. Les analyses des variances ont été faites à l'aide du test bilatéral de *t* pour des échantillons indépendants. Des analyses de comparaisons post-test de Scheffe révèlent, avec les critères habituels, les valeurs de significances. Les diverses analyses ont été faites grâce au logiciel InStat 3.00 de la compagnie GraphPad pour Windows© 98, GraphPad Software, San Diego Californie USA. La notation suivante est utilisée pour toutes les figures traitant du taux de mort cellulaire : * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1. Introduction aux résultats

Le but premier de ce chapitre est de montrer l'effet modulateur des agonistes de la DA envers un stress oxydatif induit par la présence de MPP⁺ ou de PQ dans le milieu de culture. Tout d'abord, les résultats de l'analyse LDH mettent en évidence que les agonistes augmentent la cytotoxicité induite par le MPP⁺ et le PQ. Le H₂O₂ et le FeSO₄ ne voient pas leur toxicité augmentée par la présence d'agoniste dans le milieu de culture. L'utilisation de différents agonistes et antagonistes cible le récepteur D₂ comme fortement impliqué dans cette amplification de cytotoxicité. Le bloqueur du DAT atténue l'effet d'amplification des agonistes sur l'effet des toxines. La seconde partie montre les résultats obtenus par la technique d'immuno-buvardage et d'analyse informatique des bandes de protéines. Ces résultats montrent l'effet modulateur de la Br sur l'expression de certaines protéines (transporteurs, récepteurs et éléments du cytosquelette) exprimées dans les cellules traitées. Ces résultats démontrent aussi que les mécanismes cellulaires touchent l'expression de certaines protéines. La dernière section expliquera les difficultés rencontrées et les raisons pour lesquelles le dosage du niveau de DA n'ont pas été faits.

Enfin, les résultats obtenus dans le cadre des expériences de cytotoxicité et d'immuno-buvardage démontrent qu'il est nécessaire d'étudier les mécanismes cellulaires sous-jacents aux thérapies cliniques pour en comprendre le fonctionnement et les possibles retombées physiologiques.

3.2. Dose-réponse de l'effet de la Br chez des cellules différenciées

La figure 3.1 montre les résultats de mort cellulaire sur des cellules exprimant le phénotype neuronal (différenciation de 12 jours). Les concentrations utilisées de Br sont inscrites sur la figure, soit de 10^{-4} M à 10^{-8} M. La concentration de MPP⁺ est de 5 mM, telle que précisée dans la section 2.2.3, la coloration des colonnes est représentative des conditions de culture, i.e. des produits utilisés comme traitement. La première colonne de chaque série représente la condition où seulement la Br est insérée dans le milieu de culture. La seconde série de colonnes montre les valeurs calculées dans la condition où le MPP⁺ est utilisé conjointement avec la Br. La dernière colonne relève des conditions où seulement la toxine MPP⁺ est employée. Cette représentation des résultats sera la même pour chaque figure tout au long de la section « Résultats ». La figure 3.2 est analogue à la figure 3.1, excepté que l'utilisation du PQ (0,3 mM) remplace celle du MPP⁺. Les autres conditions restent inchangées.

Les résultats des figures 3.1 et 3.2 montrent que la toxicité de la Br seule est pratiquement nulle. Par contre, notre attention a été attirée par l'augmentation de cytotoxicité dans le cas où la Br est ajoutée dans le milieu contenant du MPP⁺. On voit que le niveau de mort cellulaire garde sensiblement le même profil d'augmentation peu importe la concentration de Br, soit environs 2 fois le niveau de mortalité induite pour le MPP⁺ seul. Le graphique 3.2 montre un profil d'augmentation similaire avec du PQ comme toxine.

Des études de cinétique ont montré que la constante de dissociation de la bromocriptine est de l'ordre de 10^{-9} M. Il est aisé de comprendre que ce seuil est dépassé par toutes les conditions qui sont à des niveaux de concentrations sursaturantes pour les récepteurs. Le fait important à retenir de ces graphiques est que les cellules différenciées sont plus sensibles au MPP⁺ et au PQ lorsqu'il y a de la Br dans le milieu de culture.

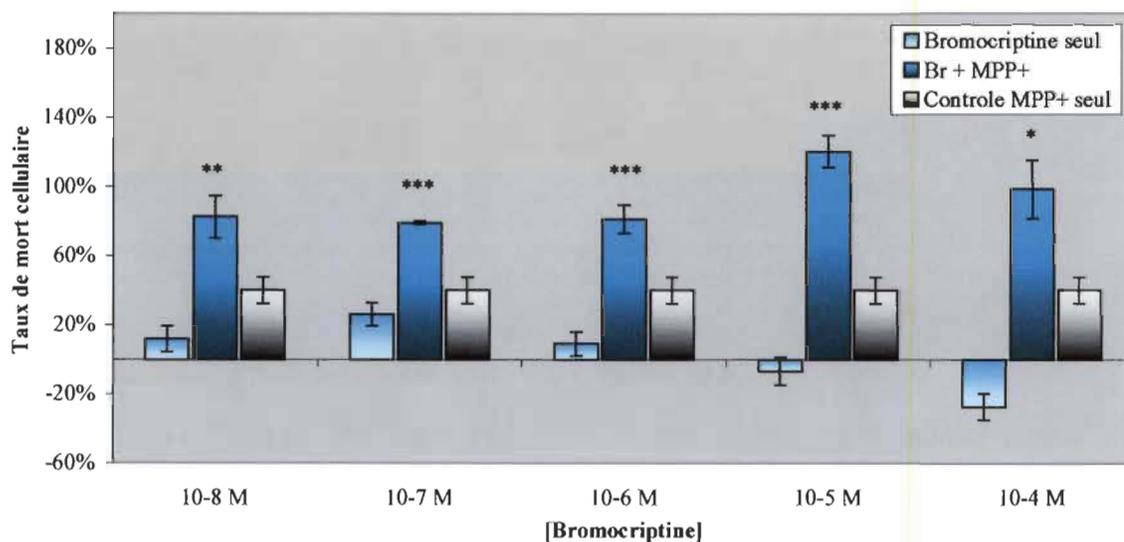


FIGURE 3.1 : Représentation graphique des résultats du calcul de pourcentage de cytotoxicité. Les résultats montrent que la présence de Br dans le milieu de culture fait doubler le niveau de mort cellulaire normalement induit par le MPP+, et ce, pour toutes les concentrations testées de l'agoniste.

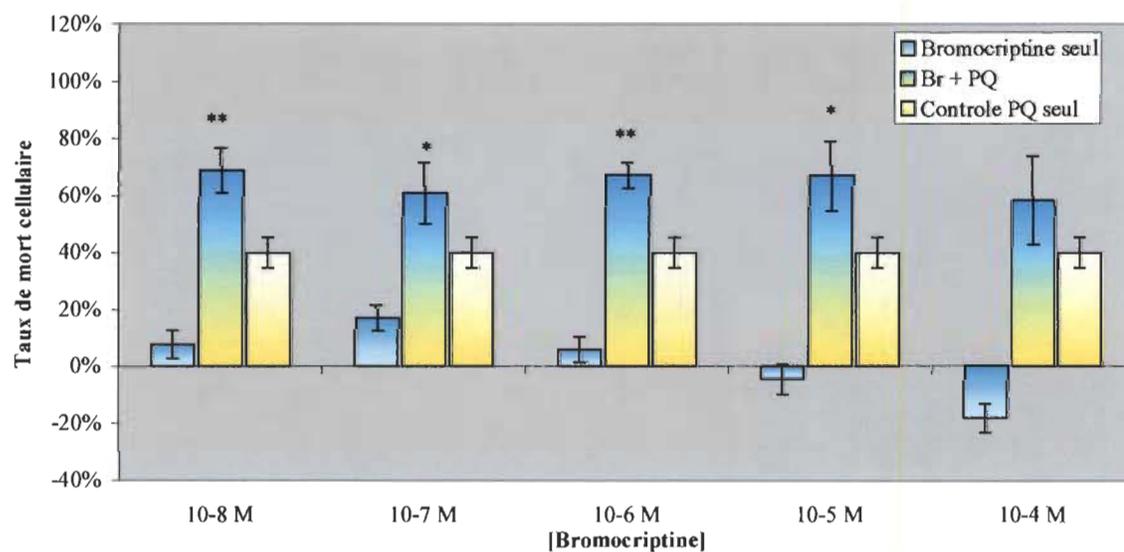


FIGURE 3.2 : Similairement à la figure précédente, il existe aussi une forte augmentation, par près d'un facteur 2, du niveau de mort cellulaire lorsqu'il y a combinaison de PQ et de Br dans le milieu de culture.

3.3. Dose-réponse de l'effet de la Br chez des cellules non-différenciées

La figure 3.3 reprend les conditions expérimentales présentées dans la figure 3.1, sauf que les cellules n'expriment pas le phénotype neuronal. La concentration de Br varie de 10^{-8} M jusqu'à 10^{-5} M. La figure 3.4 montre les résultats obtenus lorsque le Qp est utilisé à la place de la Br.

L'analyse des résultats de la figure 3.3 démontre le même caractère sensibilisant de la Br face au MPP+ dans le cas où les cellules ne sont pas différenciées. De plus, la figure 3.4 montre le même profil avec un autre agoniste, le Qp. Les interprétations sur cet effet par 2 agonistes seront discutées dans le prochain chapitre. Comme les effets des agonistes ont le même profil de mort cellulaire dans les 4 cas de figures présentées, les résultats suivants ne traiteront que des cellules non-différenciées.

3.4. Effet du bloqueur du transporteur de la DA (GBR)

La figure 3.5 montre les résultats obtenus en utilisant la Br, le MPP+ et le GBR. Les concentrations sont de 10^{-8} M pour la Br, de 5 mM pour le MPP+ et de 10^{-5} M pour le GBR. Les conditions associées aux différents résultats sont décrites sur la figure 3.5. La figure 3.6 reprend les mêmes conditions expérimentales, à la différence que la toxine est ici le PQ (1 mM).

La figure 3.5 montre que la présence d'un bloqueur du transporteur de la DA, le GBR, vient atténuer significativement cette sensibilisation accrue des cellules au MPP+. Par contre, cette diminution n'est pas totale. Pour le mélange MPP+-GBR, il y a diminution du taux de mort cellulaire, alors ceci vient confirmer que le MPP+ entre par le transporteur de la DA. La raison pour laquelle le taux de mort ne descend pas à zéro peut s'expliquer par le fait que la dose de MPP+ utilisée est très grande comparativement à ce qui est nécessaire dans des conditions expérimentales *in vivo*. La raison pour utiliser une telle concentration est une question de temps

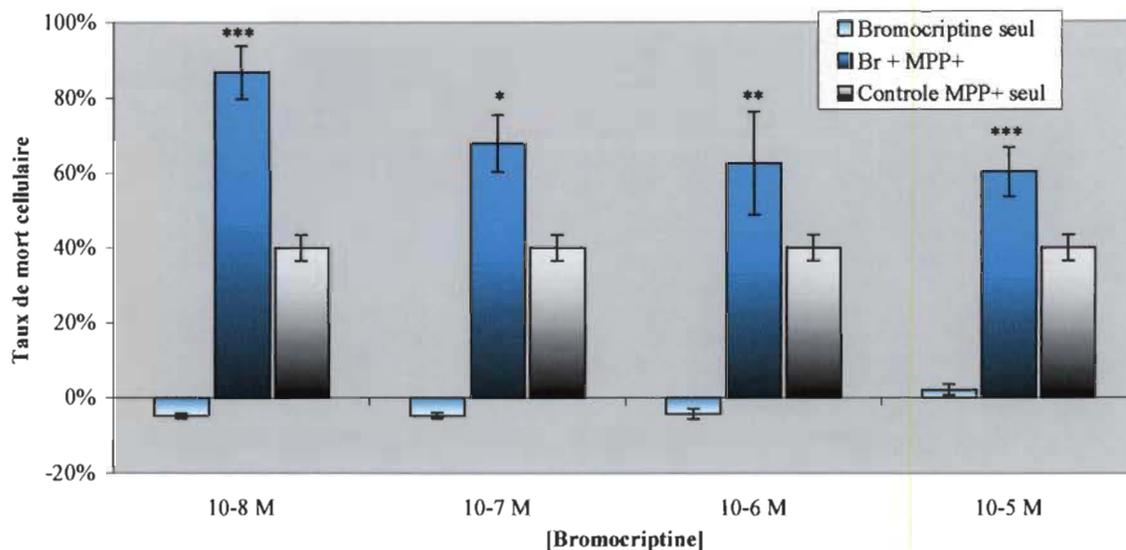


FIGURE 3.3 : Ces résultats obtenus sur des PC12 non-différenciées montrent le profil de toxicité du MPP+ et de la Br. On note encore une augmentation par un facteur 2 par rapport au contrôle MPP+ seul.

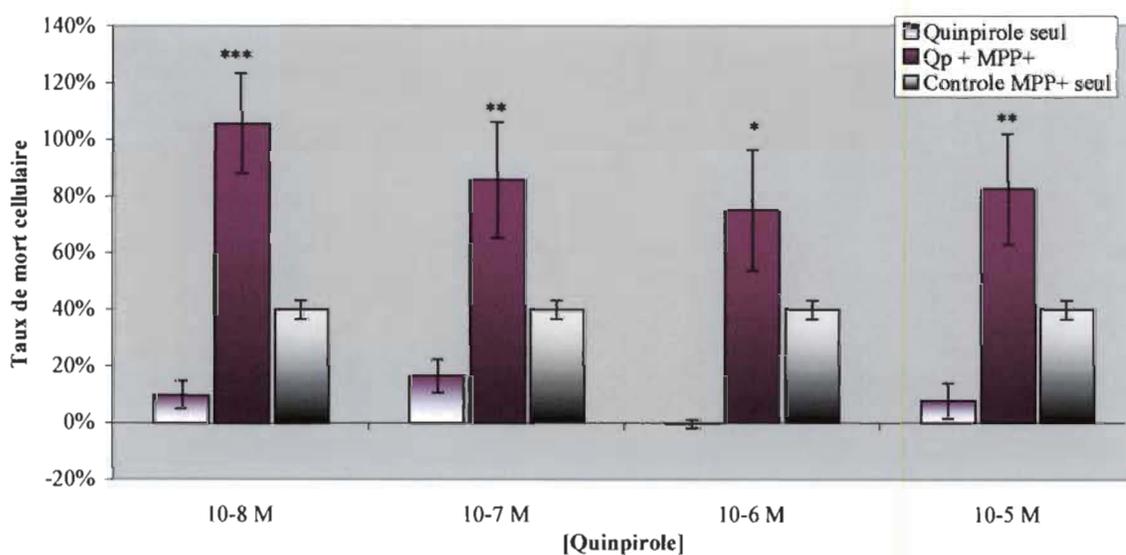


FIGURE 3.4 : Similairement à la figure précédente, ces résultats montrent l'effet de toxicité du MPP+ avec cette fois l'utilisation du Qp, un autre agoniste dopaminergique, sur des cellules non-différenciées.

d'incubation, relativement court dans notre cas grâce à la concentration. Une dose-réponse similaire est possible avec des concentrations plus faibles avec des temps de l'ordre de plusieurs jours. Les résultats de la section 3.7 serviront de complément pour expliquer ce phénomène. La figure 3.6 montre que le PQ peut aussi voir son effet toxique diminué lorsqu'il est en présence du bloqueur (GBR). En résumé, ces figures montrent que le DAT est impliqué dans l'augmentation de la mort cellulaire. Une interprétation sur le mécanisme d'action du PQ sera faite dans le prochain chapitre.

3.5. Effet des antagonistes de la DA

La figure 3.7 et 3.8 présentent les résultats de traitements avec les antagonistes DA. La Br (10^{-8} M), le MPP+ (5 mM) et le Sul (10^{-7} M) ont été utilisé pour la figure 3.7. Pour la figure 3.8 les traitements utilisent la Br (10^{-8} M), le MPP+ (5 mM) et le Spi (10^{-7} M). Les conditions sont écrites au-dessus des résultats.

La figure 3.7 montre que l'ajout d'un antagoniste du récepteur D_2 , le Sul, vient empêcher l'effet de sensibilisation observé auparavant. Cette « inhibition de sensibilisation » est important car sa présence implique beaucoup au niveau des conclusions et des interprétations des résultats. De plus, ces 2 figures mettent en évidence que c'est bien le récepteur D_2 qui est impliqué dans l'augmentation observée.

3.6. Cytotoxicité induite par d'autres agents stressants

Dans le but de montrer que l'effet d'amplification de la toxicité induit par les agonistes implique les récepteurs de la DA et le DAT, des expériences utilisant d'autres agents oxydatifs ont été faites. La figure 3.9 traite des résultats de comparaison entre 2 types de traitements oxydatifs : le MPP+ et le H_2O_2 . Les 2 premières colonnes montrent à nouveau le niveau de mort cellulaire entre le MPP+ et le mélange Br-MPP+. Les autres résultats montrent l'effet sur la mort cellulaire d'un traitement au H_2O_2 et d'un traitement combinatoire Br- H_2O_2 . La figure 3.10 reprend la même organisation de résultats, sauf que le mélange $FeSO_4$ - H_2O_2 (à même concentration) à été utilisé à la place du H_2O_2 .

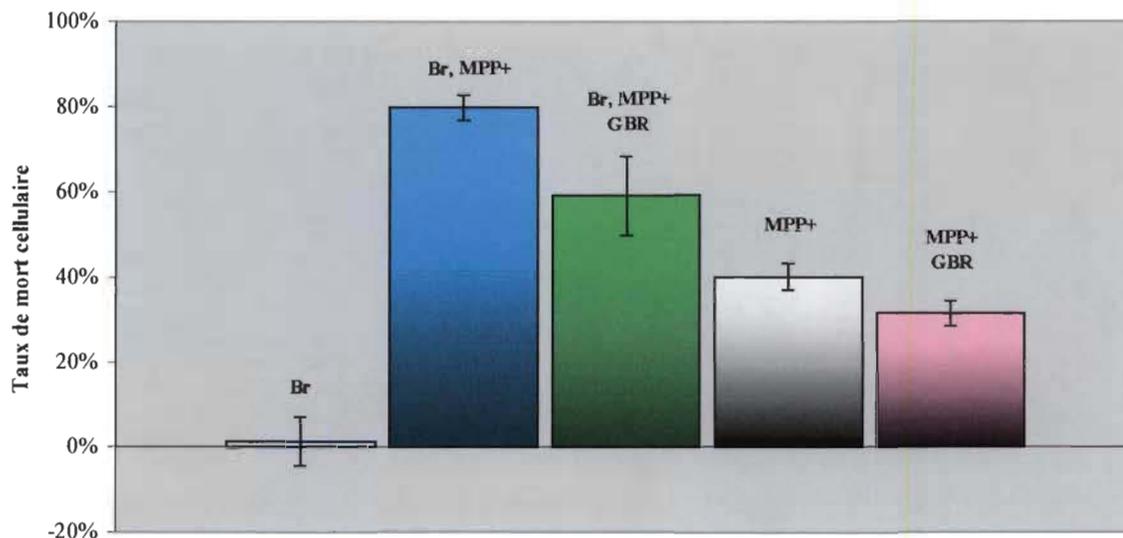


FIGURE 3.5 : Cette figure montre que le bloqueur du transporteur de la DA, le GBR (10^{-7} M), atténue significativement l'effet amplificateur de la Br (10^{-8} M) (Br-MPP+ vs Br-MPP+-GBR : $p = 0.0021$). De plus, ajouté au MPP+, ce bloqueur ne diminue pas significativement la toxicité du MPP+ (MPP+ vs MPP+-GBR : $p = 0,3594$).

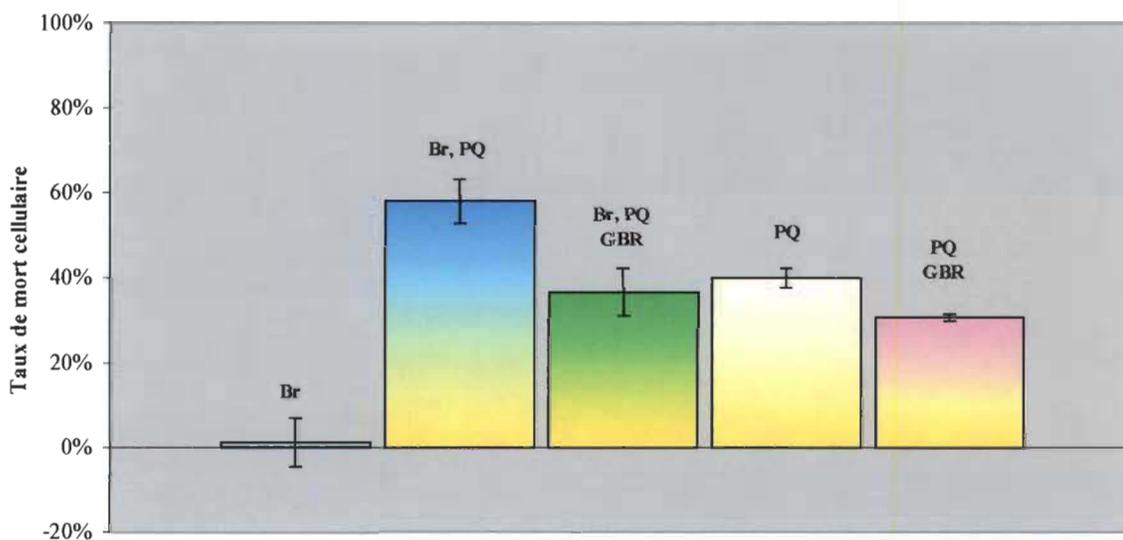


FIGURE 3.6 : La figure montre que l'effet amplificateur de la Br (10^{-8} M) est complètement bloqué par le GBR (10^{-7} M) (Br-PQ vs Br-PQ-GBR : $p < 0.0001$) lorsque la toxine utilisée est le PQ. Le GBR atténue significativement la toxicité de PQ (PQ vs PQ-GBR : $p = 0.0004$).

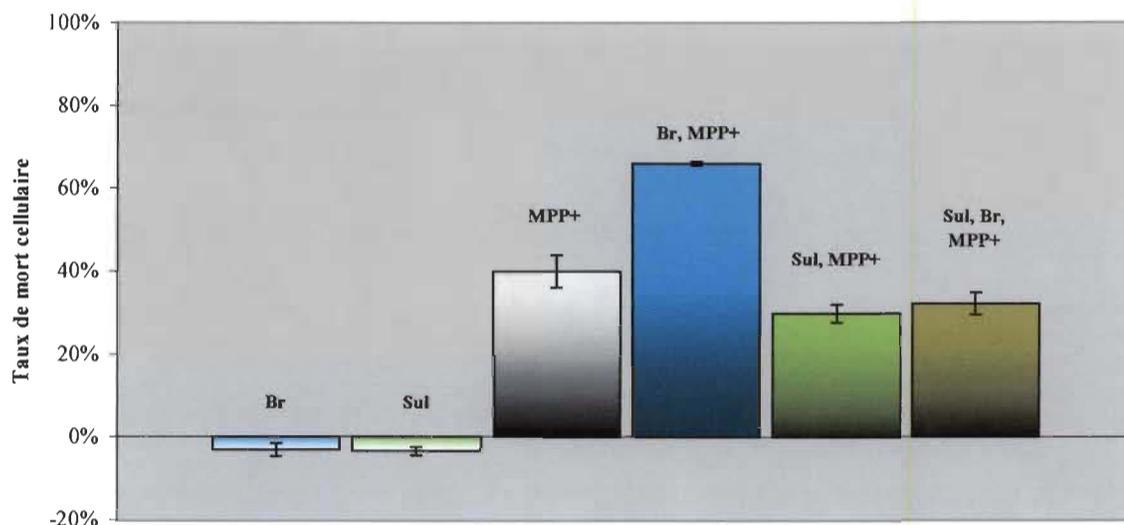


FIGURE 3.7 : Les résultats montrent que la présence de Sul (10^{-8} M) dans le mélange Br-MPP+ vient contrecarrer la hausse de la mort cellulaire (Br-MPP+ vs Br-MPP+-Sul : $p < 0.0001$). L'antagoniste dopaminergique n'a pas d'influence sur le niveau de toxicité du MPP+ (MPP+ vs MPP+-Sul : $p = 0.6999$).

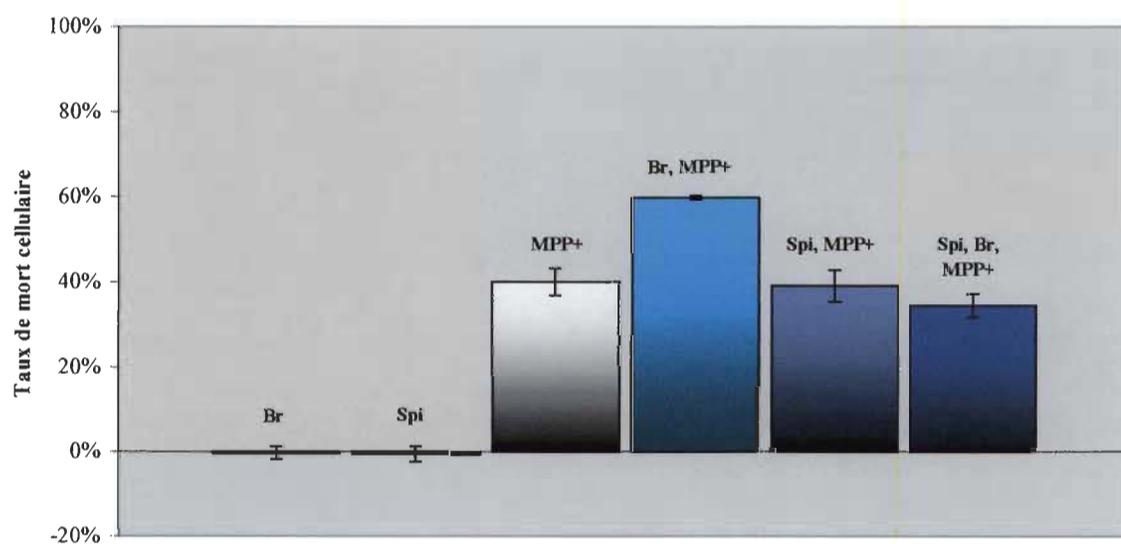


FIGURE 3.8 : L'ajout du Spi (10^{-8} M) crée les mêmes effets que le Sul. Il bloque l'effet d'amplification (Br-MPP+ vs Br-MPP+-Spi : $p < 0.0001$) et n'a pas d'effet direct sur le niveau de mort cellulaire du MPP+ (MPP+ vs MPP+-Spi : $p = 0.3783$).

La figure 3.9 montre que la présence de bromocriptine dans un milieu de culture utilisant le H_2O_2 n'induit pas une sensibilisation accrue des cellules, car la différence de niveau de cytotoxicité est non-significative entre le H_2O_2 seul et le mélange Br- H_2O_2 . La figure 3.10 montre par contre que le mélange fortement oxydant $FeSO_4$ - H_2O_2 voit son effet toxique augmenter avec l'ajout de la bromocriptine dans le milieu cellulaire.

3.7. Résultats SDS-PAGE / Immuno-buvardage et analyses d'images

Les résultats montrent l'effet de la Br et du MPP⁺ sur l'expression de la tyrosine hydroxylase (TH) (figure 3.11) et du DAT (figure 3.12) dans le milieu intracellulaire.

La figure 3.11 montre l'effet de la Br et du MPP⁺ sur la quantité relative de tyrosine hydrolase exprimée dans le milieu intracellulaire. Les cellules n'ayant subi aucun traitement servent de valeur de référence comme contrôle (100%). Les conditions d'incubation sont identiques aux conditions précédemment énoncées dans ce chapitre. Dans toutes les conditions testées, la quantité de TH n'est pas altérée. Par contre, la figure 3.12 rapporte que la quantité de transporteur de la DA est plus grande lorsque les cellules sont traitées avec la Br ou le MPP⁺, ce qui a été aussi observé par Mayfield *et al* (25).

3.8. Dosage de la DA

Il était nécessaire de mesurer le niveau de DA extracellulaire du milieu de culture dans les différentes conditions de traitement. Ces conditions devraient montrer une diminution du niveau de DA en présence d'agonistes et d'une augmentation ou une immobilisation du niveau de DA en présence d'antagonistes. La mesure de la DA en solution exige une connaissance approfondit de l'électrochimie et des diverses lois pour mettre au point un protocole efficace, ce qui devient hors de la portée des exigences de ma maîtrise. Le protocole a été mis au point dans le laboratoire du Dr Di Paolo à l'université Laval, qui a en sa possession la technologie nécessaire pour doser cette DA. Le montage consiste en appareil pour faire de la chromatographie liquide à haute pres-

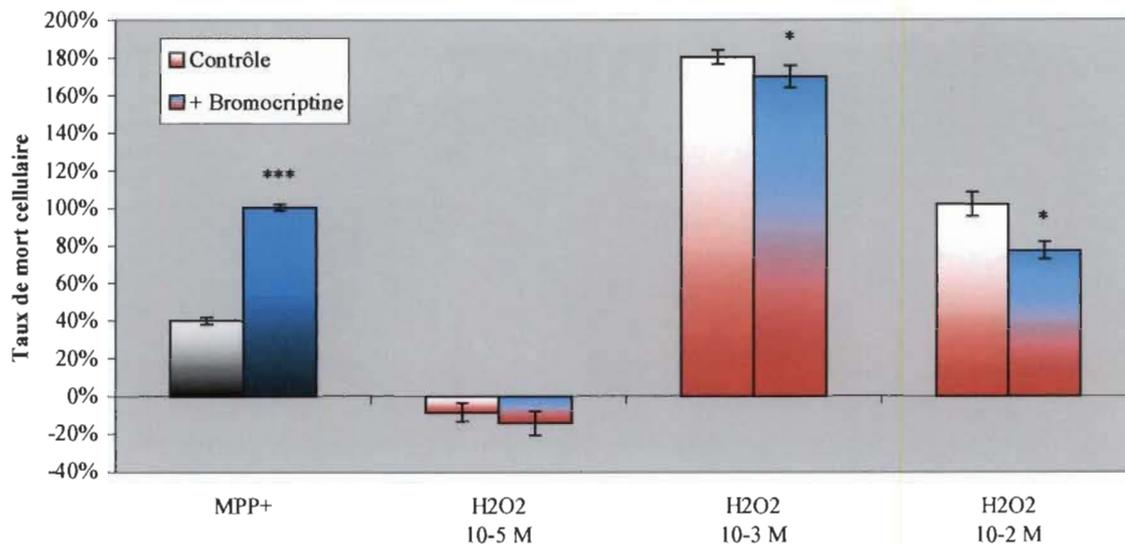


FIGURE 3.9 : L'effet oxydatif du peroxyde d'hydrogène n'est pratiquement pas influencé ($p \geq 0.0353$) par la présence de Br dans le milieu de culture.

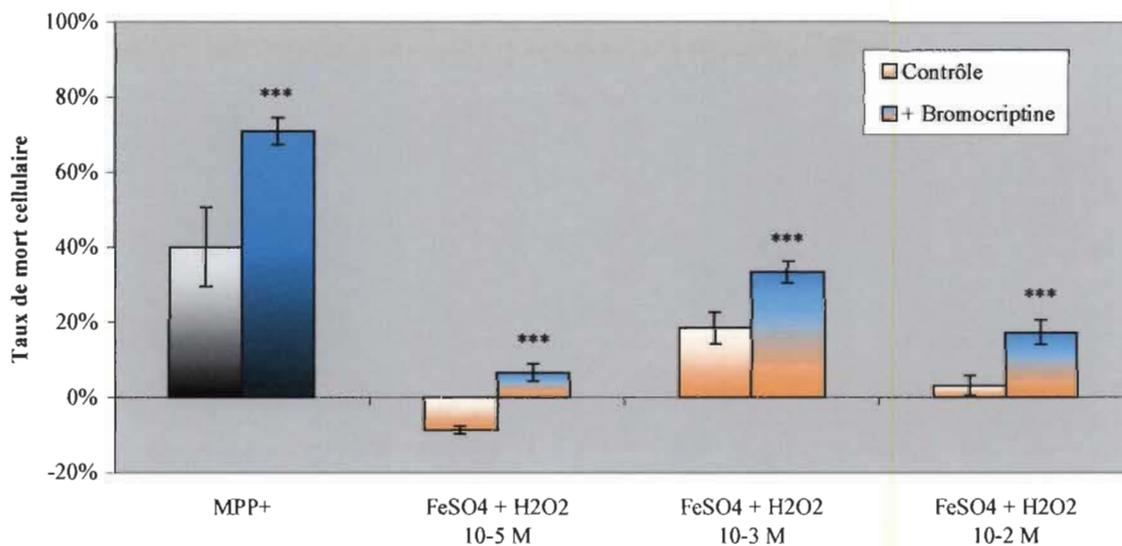


FIGURE 3.10 : L'effet du mélange Ferreux (FeSO_4 et H_2O_2) et de la Br fait significativement augmenter le niveau de mort cellulaire par rapport aux contrôles du mélange Ferreux seul. Le ratio est toutefois plus petit que celui entre le Br-MPP+ et le MPP+ seul.

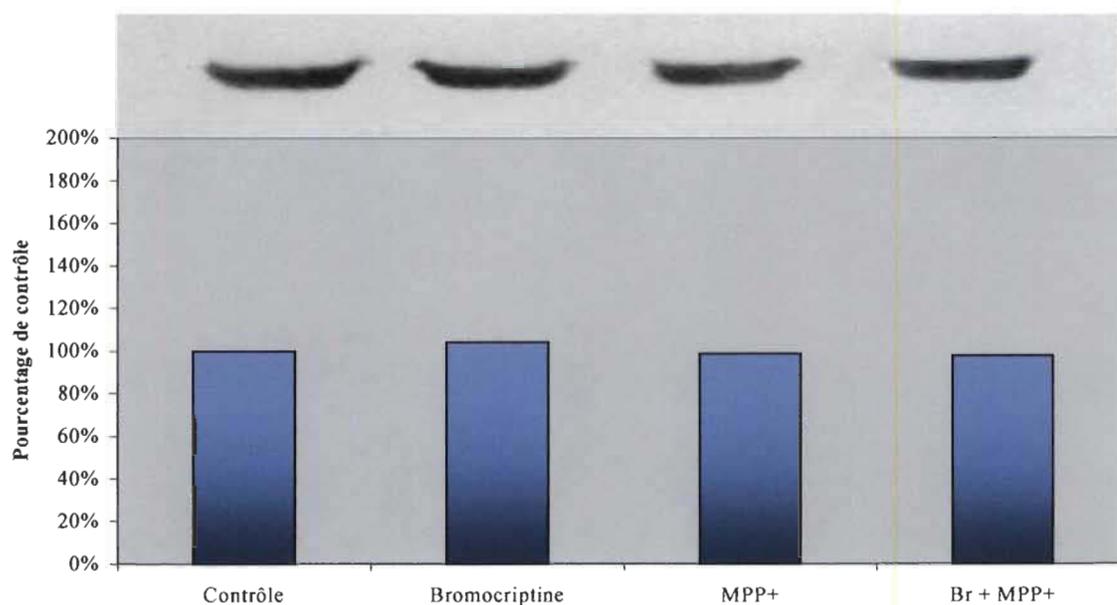


FIGURE 3.11 : Ces résultats montrent que le MPP+ ou la Br n'ont pratiquement aucun effet sur l'expression de la tyrosine hydrolase.

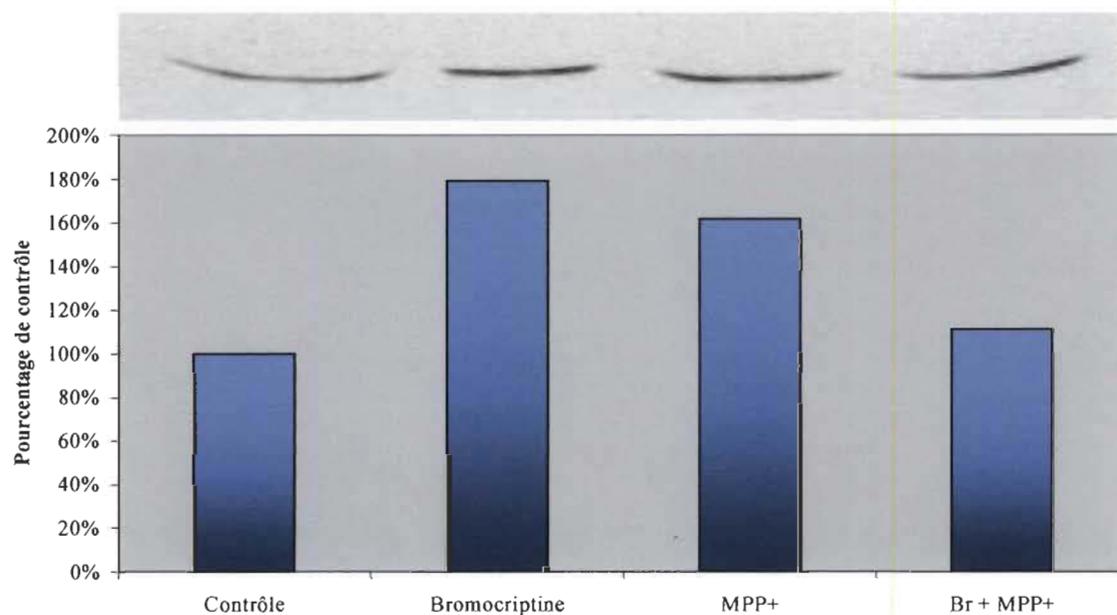


FIGURE 3.12 : Ces résultats montrent que la Br induit une production presque doublée du DAT. L'influence du MPP+ est toutefois légèrement moins apparente, et la combinaison des 2 produits fait redescendre presque au niveau basal l'expression du DAT.

sion, couplé à un module de détection électrochimique (HPLC-ED). Par contre, des délais hors de notre contrôle ont empêché l'acquisition des résultats. Ces résultats de dosage de la DA ne seront pas inclus dans mon mémoire. Des mesures seront prises prochainement dans le laboratoire du Dr Kah à l'Université de Rennes (France) afin de pouvoir mesurer cette concentration de DA extracellulaire.

3.9. Résumé des résultats

En somme, les résultats par la mesure de la LDH extracellulaire montrent que les agonistes de la DA augmentent la cytotoxicité induite par le MPP⁺ et le PQ. Le bloqueur du transporteur de la DA vient atténuer cette cytotoxicité et les antagonistes bloquent l'augmentation de la mort cellulaire causée par les agonistes. Le niveau de mort cellulaire induit par le H₂O₂ ne semble pas influencé par la présence d'agonistes dans le milieu de culture. Le mélange ferreux est par contre influencé, mais dans un ordre de grandeur plus petit que les 2 toxines principales.

Les analyses par informatique des immuno-buvarages des protéines cellulaires montrent que le niveau de tyrosine hydroxylase reste stable en présence de MPP⁺ et de Br dans le milieu de culture. Le niveau de DAT augmente si le milieu contient de la Br ou du MPP⁺, mais ne montre pas un effet additif quand les deux produits sont ensemble dans le milieu de culture.

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans cette section nous tenterons de montrer que les résultats obtenus dans le cadre des expériences de cytotoxicité et d'immuno-buvardage peuvent mettre une certaine lumière sur les mécanismes de sensibilisation accrue des cellules par l'ajout des agonistes dopaminergiques. Nous expliquerons par la suite comment l'effet est propre aux agonistes et qu'il est possible de bloquer la sensibilisation par des antagonistes et des bloqueurs du transporteur de la DA.

4.1. Mécanisme apparent de la mort cellulaire

De la première série de mesure, qui montrait que la Br induit une hausse de la mort cellulaire avec du MPP+ chez des PC12 différenciées, les questions étaient donc les suivantes :

- Est-ce que la Br est le seul agoniste à produire cet effet ?
- Est-ce qu'une autre toxine produit les mêmes effets ?
- Est-ce un effet spécifique à la différenciation par le NGF ?
- Pourquoi y a-t-il une sensibilisation ?

Pour la première question : Les résultats des tests avec le Qp montrent un profil similaire à celui de la Br, donc l'effet n'est pas spécifique à la Br. Nous pouvons donc dire que l'effet de sensibilisation est médié par le récepteur D₂. Ceci est plausible, car les cellules possèdent déjà un caractère « catécholamine », donc possèdent la machinerie nécessaire à la production des récepteurs membranaires de type DA.

Pour la seconde question : Nous savons que le MPP+ est internalisé par le DAT dans la cellule. Comme le mécanisme d'entrée du PQ dans la cellule n'est pas encore défini (section 1.2.4), on peut penser que cette seconde toxine passe aussi par le DAT, car sa structure est analogue au MPP+. Effectivement, les résultats montrent que la

cytotoxicité du PQ augmente avec l'ajout de Br dans le milieu de culture. Jusqu'à maintenant, il n'est pas possible d'être certain du mécanisme d'action de la PQ, car d'autres points sont à vérifier.

Pour la troisième question : les résultats ont montré le même profil de cytotoxicité entre les cellules différenciées et non-différenciées. Ce sont alors les cellules non-différenciées qui ont été employé pour le restant des expériences. Les résultats impliquent que l'ajout du NGF et les mécanismes liés à la différenciation cellulaire ne seraient pas en cause dans la sensibilité à la Br.

Pour la quatrième question : l'hypothèse courante de l'augmentation de mort cellulaire par l'ajout des agonistes est celle qui implique que l'entrée du MPP+ dans la cellule est facilitée par l'agoniste D₂. Si le MPP+ entre davantage dans les cellules, plus de cellules meurent. La façon la plus efficace de montrer que le MPP+ serait le seul agent inducteur de mort cellulaire est de l'empêcher de rentrer dans les cellules. L'utilisation du GBR diminue significativement ($p = 0,0021$) l'augmentation du taux de mort cellulaire par la Br en bloquant l'accès (le DAT) du MPP+ à la cellule. Le DAT semble impliqué dans cette cascade de mort cellulaire.

Les questions suivantes se posent à ce point :

- À quel niveau le DAT est-il responsable de la sensibilisation ?
- Pourquoi et comment le bloqueur réduit la sensibilité ?
- En est-il de même avec le PQ ?

Pour les 3 dernière questions : Les résultats montrent une atténuation de la toxicité du PQ par le GBR qui nous amène à supposer à nouveau que le PQ utilise le DAT pour intégrer la cellule. L'augmentation de la toxicité du PQ par la Br est aussi contrecarrée par la présence du GBR, ce qui viendrait montrer qu'il existe une relation étroite entre le récepteur D₂, le PQ et le DAT.

C'est à partir de ce point qu'on peut émettre différentes hypothèses concernant les mécanismes responsables de cet effet :

- Les composantes qui caractérisent les neurones dopaminergique (incluant la production et la sécrétion de DA, le DAT, les récepteurs D₂ et la mécanique interne de communication) sont présentes que les cellules soient différenciées ou non.
- On sait que les cellules sont plus sensibles au MPP⁺ lorsqu'il y a de la Br. L'activation des récepteurs D₂ arrête la synthèse de la DA dans les vésicules intracellulaires et diminue le relargage du contenu de ces vésicules à l'extérieur de la cellule (60). Les transporteurs restent actifs lors de l'activation de D₂, ce qui implique que le niveau extracellulaire normalement isotonique de DA va tendre à diminuer rapidement avec le temps. Comme on sait que la recapture du MPP⁺ et de la DA se fait par le DAT, il existe probablement un phénomène de compétition entre les deux molécules pour utiliser le DAT. Si le niveau de DA chute dans le milieu extracellulaire, le MPP⁺ rencontre moins de compétition pour entrer dans la cellule. La mesure de la recapture de MPP⁺ et le dosage extracellulaire de la DA pourraient aider à soutenir cette hypothèse.
- De plus, on sait que le MPP⁺ diminue l'activité de la TH (61). Si l'activité de la TH diminue, la production de DA disponible pour l'excrétion diminue aussi. Nos résultats montrent que l'expression de cet enzyme n'est pas altérée ni par le MPP⁺ ou la Br. Une possibilité est que le récepteur D₂ vient influencer à la baisse l'activité de la TH, favorisant la diminution de DA disponible. Une méthode impliquant un précurseur radioactif (ou fluorescent) de la DA et du dosage de cette DA marquée pourrait affirmer ou infirmer cette autre hypothèse.
- D'autres expériences montrent que l'expression du DAT, et son activité, augmente lorsque les récepteurs D₂ sont activés (25), ce qui ferait augmenter la recapture de DA extracellulaire (62).
- Si l'augmentation de la mort cellulaire induite par le PQ est causée par un agoniste D₂, c'est que le PQ utilise probablement le même mécanisme d'internalisation que le MPP⁺. Surtout si le rapport de mort cellulaire du PQ seul avec le mélange PQ-GBR est supérieur à 1.

L'utilisation des 2 antagonistes du récepteur D_2 , le Sul et le Spi, vient empêcher l'effet de sensibilisation de se produire. Cela vient appuyer l'hypothèse que c'est bien le récepteur D_2 qui est en cause. Le Sul et le Spi ont plus d'affinité que la Br pour le récepteur D_2 . Le récepteur D_2 , une fois inactivé (bloqué), doit faire réagir la cellule de façon normale au MPP⁺, Br ou pas (l'antagoniste n'agit pas comme agoniste inverse) (63). Si c'était le cas, le fait d'inhiber l'inhibition du relargage (i.e. de favoriser la sortie de la DA dans le milieu extracellulaire) devrait faire diminuer le niveau de mort cellulaire. Ceci irait à l'encontre des résultats présentés dans les figures 3.7 et 3.8, car ceux-ci restent égaux aux contrôles de mort cellulaire qui est causée par les toxines.

La littérature rapporte que d'autres agents oxydants peuvent venir causer une cascade létale chez les cellules dopaminergiques par des voies non-spécifiques : le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les métaux cationiques (Fe^{2+} , Cu^{2+} et Mn^{2+}), les produits de la chaîne respiratoire mitochondriale, etc. Dans nos expériences, l'utilisation du H_2O_2 comme toxine oxydative n'aboutit pas significativement à l'effet de sensibilisation vue dans le cas où le MPP⁺ ou le PQ est employé. L'effet de sensibilisation n'est pas causé par une diffusion simple du MPP⁺ (ou du PQ) dans les cellules, alors tout le système D_2 /DAT est impliqué activement. Le complexe ferreux induit un profil de mort cellulaire significativement similaire à celui du MPP⁺ ou du PQ en présence de Br. L'impact n'est pas aussi fort que celui obtenu avec les résultats obtenus pour les autres toxines, par contre. Ce phénomène échappe toutefois aux interprétations que nous pouvons faire à partir des données recueillies. Cette voie reste à approfondir.

En somme, les résultats d'analyse par la LDH semblent montrer qu'il existe un lien étroit entre les récepteurs D_2 et les DAT. Comme les résultats d'immuno-buvarpage le montrent, l'ajout de la Br dans le milieu de culture fait augmenter l'expression du transporteur. De plus, la littérature fait état d'une activation et/ou d'une translocation des DAT à la surface de la cellule qui serait médié par l'activation des récepteurs DA, ce qui vient appuyer nos hypothèses. Il serait intéressant de montrer que la recapture du MPP⁺ ou du PQ est altérée par la présence d'un agoniste DA. Une analyse du niveau extracellulaire de DA pourra permettre d'affirmer s'il est question de compétition

DA/MPP+ au niveau du passage par le DAT ou si c'est uniquement l'expression du DAT qui est en cause.

4.2. Conclusions

En somme, les résultats obtenus pendant mes travaux de maîtrise montrent qu'il n'y a pas de neuroprotection associée aux agonistes de la DA pour des cellules ayant subi un stress oxydatif par les toxines utilisées. Nos résultats montrent en plus que ces agonistes DA favorisent même la mort cellulaire causée par les toxines. À partir des résultats obtenus, il est possible de faire des hypothèses sur les mécanismes de cette facilitation de la mort cellulaire. Il semble exister un lien plus étroit entre le récepteur D₂ et le DAT que ce qui a été trouvé jusqu'à maintenant.

De plus, les résultats obtenus aident à jeter une certaine lueur sur les mécanismes d'actions d'une toxine environnementale, le paraquat, qui n'a pas encore été caractérisée dans la littérature jusqu'à aujourd'hui. Cette toxine est toujours en utilisation aujourd'hui dans certains champs. De plus, nos résultats et interprétations peuvent amener certains points importants dans la compréhension de l'étiologie de la MP. Cette maladie à caractère neurodégénératif pourrait être prévenue à l'aide des bons médicaments, au lieu de simplement guérie. Ne vaut-il pas mieux prévenir que guérir ?

ANNEXE

Tableau A1 :

Propriétés des molécules utilisées.

Molécules	Abréviation	Propriétés	Masse moléculaire	Kd
bromocriptine	Br	Agoniste D ₂	750,70	4.8 nM
GBR 12909	GBR	Bloqueur DAT	523,51	30 nM
quinpirole	Qp	Agoniste D ₂	255,79	4.8 nM
spiperone	Spi	Antagoniste D ₂	445,96	0.06 nM
sulpiride	Sul	Antagoniste D ₂	341,42	0.9 nM

Figure A1 :

Molécules utilisées dans nos recherches.

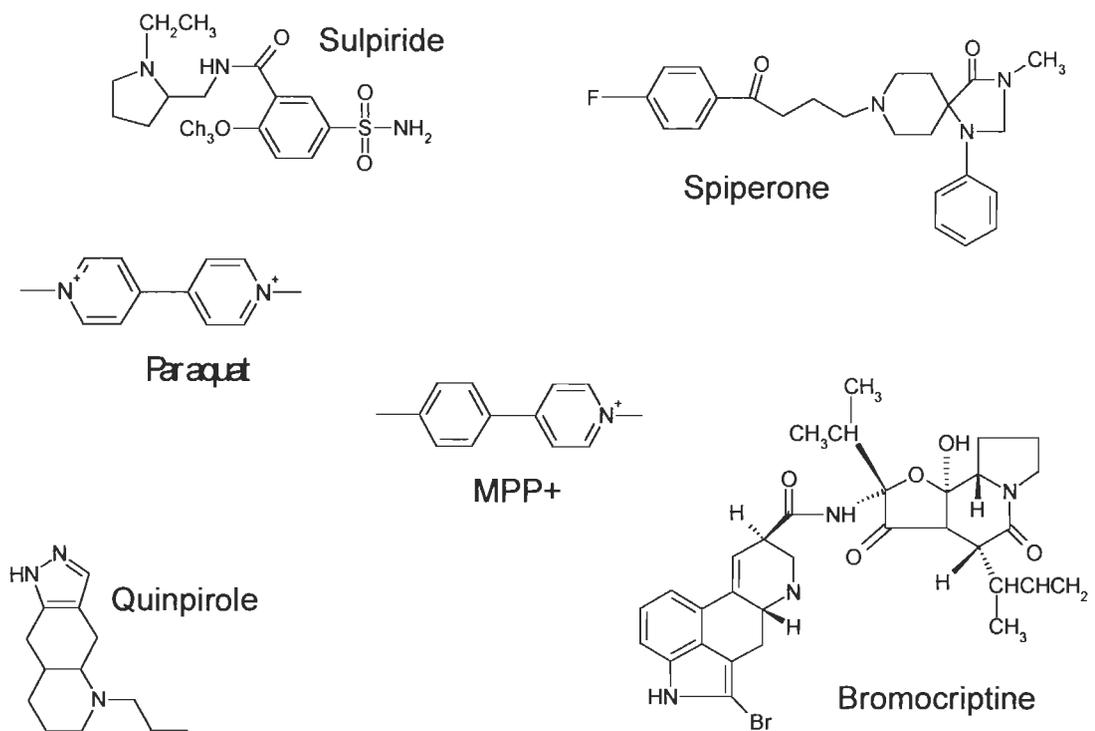
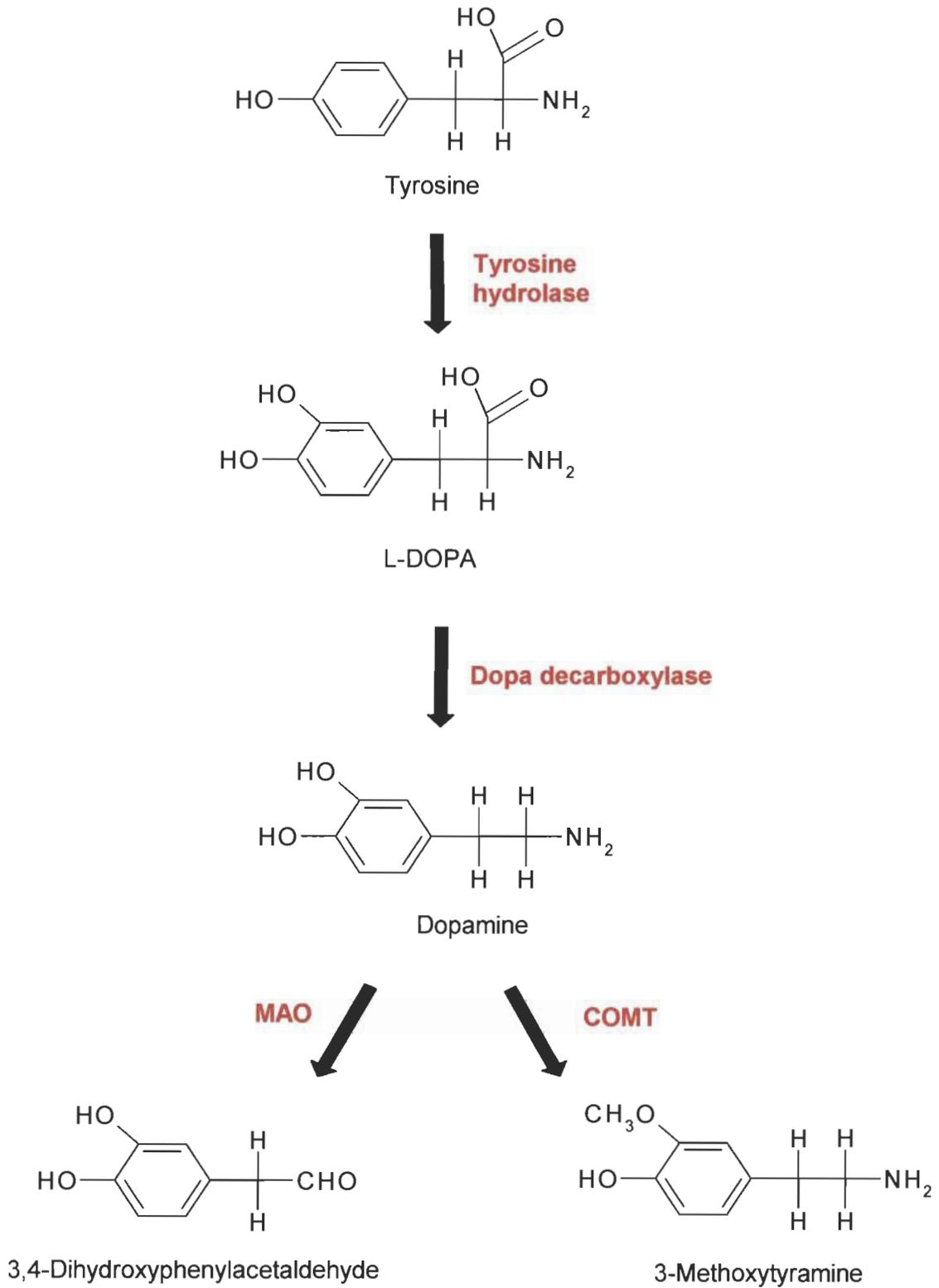


Figure A2

Schéma des voies métaboliques de la DA



BIBLIOGRAPHIE

1. Marsden, C. D., "Parkinson's disease", *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57, 672-81 (1994)
2. Kemoun, G. and Defebvre, L., "[Gait disorders in Parkinson disease. Clinical description, analysis of posture, initiation of stabilized gait]", *Presse Med* 30, 452-9 (2001)
3. Ebersbach, G., Sojer, M., Valldeoriola, F., Wissel, J., Muller, J., Tolosa, E. and Poewe, W., "Comparative analysis of gait in Parkinson's disease, cerebellar ataxia and subcortical arteriosclerotic encephalopathy", *Brain* 122 (Pt 7), 1349-55 (1999)
4. Litvan, I., Goetz, C. G., Jankovic, J., Wenning, G. K., Booth, V., Bartko, J. J., McKee, A., Jellinger, K., Lai, E. C., Brandel, J. P., Verny, M., Chaudhuri, K. R., Pearce, R. K. and Agid, Y., "What is the accuracy of the clinical diagnosis of multiple system atrophy? A clinicopathologic study", *Arch Neurol* 54, 937-44 (1997)
5. Litvan, I., Booth, V., Wenning, G. K., Bartko, J. J., Goetz, C. G., McKee, A., Jankovic, J., Jellinger, K., Lai, E. C., Brandel, J. P., Verny, M., Chaudhuri, K. R., Pearce, R. K. and Agid, Y., "Retrospective application of a set of clinical diagnostic criteria for the diagnosis of multiple system atrophy", *J Neural Transm* 105, 217-27 (1998)
6. Otsuka, M., Kuwabara, Y., Ichiya, Y., Hosokawa, S., Sasaki, M., Yoshida, T., Fukumura, T., Kato, M. and Masuda, K., "Differentiating between multiple system atrophy and Parkinson's disease by positron emission tomography with 18F-dopa and 18F-FDG", *Ann Nucl Med* 11, 251-7 (1997)
7. Playfer, J. R., "Parkinson's disease", *Postgrad Med J* 73, 257-64 (1997)
8. Menza, M. A. and Mark, M. H., "Parkinson's disease and depression: the relationship to disability and personality", *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 6, 165-9 (1994)

9. Sherer, T. B., Betarbet, R. and Greenamyre, J. T., "Pathogenesis of Parkinson's disease", *Curr Opin Investig Drugs* 2, 657-62 (2001)
10. Ransmayr, G., Wenning, G. K., Seppi, K., Jellinger, K. and Poewe, W., "[Dementia with Lewy bodies]", *Nervenarzt* 71, 929-35 (2000)
11. Pearce, J. M., "The Lewy body", *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71, 214 (2001)
12. Johansson, B. B. and Henning, M., "6-hydroxydopamine and the blood-brain barrier in adult conscious rats", *Acta Physiol Scand* 110, 1-4 (1980)
13. Delrue-Perollet, C., Li, K. S., Vitiello, S. and Neveu, P. J., "Peripheral catecholamines are involved in the neuroendocrine and immune effects of LPS", *Brain Behav Immun* 9, 149-62 (1995)
14. Rouillard, C., Bedard, P. J. and Di Paolo, T., "Effects of chronic treatment of MPTP monkeys with bromocriptine alone or in combination with SKF 38393", *Eur J Pharmacol* 185, 209-15 (1990)
15. Gagnon, C., Bedard, P. J. and Di Paolo, T., "Effect of chronic treatment of MPTP monkeys with dopamine D-1 and/or D-2 receptor agonists", *Eur J Pharmacol* 178, 115-20 (1990)
16. Bedard, P. J., Mancilla, B. G., Blanchette, P., Gagnon, C. and Di Paolo, T., "Levodopa-induced dyskinesia: facts and fancy. What does the MPTP monkey model tell us?" *Can J Neurol Sci* 19, 134-7 (1992)
17. Di Paolo, T., Bedard, P., Daigle, M. and Boucher, R., "Long-term effects of MPTP on central and peripheral catecholamine and indoleamine concentrations in monkeys", *Brain Res* 379, 286-93 (1986)
18. Bedard, P. J., Di Paolo, T., Falardeau, P. and Boucher, R., "Chronic treatment with L-DOPA, but not bromocriptine induces dyskinesia in MPTP-parkinsonian monkeys. Correlation with [3H]spiperone binding", *Brain Res* 379, 294-9 (1986)
19. Rodriguez, M. C., Obeso, J. A. and Olanow, C. W., "Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection", *Ann Neurol* 44, S175-88 (1998)
20. Koek, W., "N-methyl-D-aspartate antagonists and drug discrimination", *Pharmacol Biochem Behav* 64, 275-81 (1999)

21. Creese, I. and Fraser, C. M., "Series", *In Dopamine Receptors*, Alan R Liss, (1987)
22. Amara, S. G. and Kuhar, M. J., "Neurotransmitter transporters: recent progress", *Annu Rev Neurosci* 16, 73-93 (1993)
23. Hoffman, A. F., Zahniser, N. R., Lupica, C. R. and Gerhardt, G. A., "Voltage-dependency of the dopamine transporter in the rat substantia nigra", *Neurosci Lett* 260, 105-8 (1999)
24. Kimmel, H. L., Joyce, A. R., Carroll, F. I. and Kuhar, M. J., "Dopamine D1 and D2 receptors influence dopamine transporter synthesis and degradation in the rat", *J Pharmacol Exp Ther* 298, 129-40 (2001)
25. Mayfield, R. D. and Zahniser, N. R., "Dopamine D2 receptor regulation of the dopamine transporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes is voltage-independent", *Mol Pharmacol* 59, 113-21 (2001)
26. Little, K. Y., Gorebig, J., Carroll, F. I., Mapili, J. and Meador-Woodruff, J. H., "Lack of dopamine receptor agonists effect on striatal dopamine transporter binding sites", *Brain Res* 742, 313-6 (1996)
27. Pristupa, Z. B., McConkey, F., Liu, F., Man, H. Y., Lee, F. J., Wang, Y. T. and Niznik, H. B., "Protein kinase-mediated bidirectional trafficking and functional regulation of the human dopamine transporter", *Synapse* 30, 79-87 (1998)
28. Kadowaki, K., Hirota, K., Koike, K., Ohmichi, M., Kiyama, H., Miyake, A. and Tanizawa, O., "Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate enhances dopamine accumulation in rat hypothalamic cell culture containing dopaminergic neurons", *Neuroendocrinology* 52, 256-61 (1990)
29. Davis, G. C., Williams, A. C., Markey, S. P., Ebert, M. H., Caine, E. D., Reichert, C. M. and Kopin, I. J., "Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues", *Psychiatry Res* 1, 249-54 (1979)
30. Nakamura, K., Bindokas, V. P., Marks, J. D., Wright, D. A., Frim, D. M., Miller, R. J. and Kang, U. J., "The selective toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium to dopaminergic neurons: the role of mitochondrial complex I and reactive oxygen species revisited", *Mol Pharmacol* 58, 271-8 (2000)

31. Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W. and Irwin, I., "Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis", *Science* 219, 979-80 (1983)
32. Crossman, A. R., Clarke, C. E., Boyce, S., Robertson, R. G. and Sambrook, M. A., "MPTP-induced parkinsonism in the monkey: neurochemical pathology, complications of treatment and pathophysiological mechanisms", *Can J Neurol Sci* 14, 428-35 (1987)
33. Langston, J. W. and Ballard, P. A., Jr., "Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine", *N Engl J Med* 309, 310 (1983)
34. Tipton, K. F. and Singer, T. P., "Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds", *J Neurochem* 61, 1191-206 (1993)
35. Dunnett, S. B. and Bjorklund, A., "Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease", *Nature* 399, A32-9 (1999)
36. Liou, H. H., Tsai, M. C., Chen, C. J., Jeng, J. S., Chang, Y. C., Chen, S. Y. and Chen, R. C., "Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan", *Neurology* 48, 1583-8 (1997)
37. Hertzman, C., Wiens, M., Bowering, D., Snow, B. and Calne, D., "Parkinson's disease: a case-control study of occupational and environmental risk factors", *Am J Ind Med* 17, 349-55 (1990)
38. Rajput, A. H., Uitti, R. J., Stern, W., Lavery, W., O'Donnell, K., O'Donnell, D., Yuen, W. K. and Dua, A., "Geography, drinking water chemistry, pesticides and herbicides and the etiology of Parkinson's disease", *Can J Neurol Sci* 14, 414-8 (1987)
39. Costantini, P., Petronilli, V., Colonna, R. and Bernardi, P., "On the effects of paraquat on isolated mitochondria. Evidence that paraquat causes opening of the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore synergistically with nitric oxide", *Toxicology* 99, 77-88 (1995)
40. Molck, A. M. and Friis, C., "Transport of paraquat by isolated renal proximal tubular segments from rabbits", *Pharmacol Toxicol* 83, 208-13 (1998)

41. Day, B. J., Patel, M., Calavetta, L., Chang, L. Y. and Stamler, J. S., "A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase", *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12760-5 (1999)
42. Brooks, A. I., Chadwick, C. A., Gelbard, H. A., Cory-Slechta, D. A. and Federoff, H. J., "Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss", *Brain Res* 823, 1-10 (1999)
43. Li, X. and Sun, A. Y., "Paraquat induced activation of transcription factor AP-1 and apoptosis in PC12 cells", *J Neural Transm* 106, 1-21 (1999)
44. Corona-Morales, A. A., Castell, A. and Zhang, L., "L-DOPA-induced neurotoxic and apoptotic changes on cultured chromaffin cells", *Neuroreport* 11, 503-6 (2000)
45. Misu, Y., Furukawa, N., Arai, N., Miyamae, T. and Goshima, Y., "[Is endogenously released DOPA itself an upstream factor for increase in glutamate release and delayed neuronal cell death induced by transient ischemia in rats?]", *Nippon Yakurigaku Zasshi* 112 Suppl 1, 93P-97P (1998)
46. Alexander, T., Sortwell, C. E., Sladek, C. D., Roth, R. H. and Steece-Collier, K., "Comparison of neurotoxicity following repeated administration of l-dopa, d-dopa and dopamine to embryonic mesencephalic dopamine neurons in cultures derived from Fisher 344 and Sprague-Dawley donors", *Cell Transplant* 6, 309-15 (1997)
47. Zietlow, R., Dunnett, S. B. and Fawcett, J. W., "Addition of fresh blood to intrastriatal grafts of embryonic mesencephalon into the hemiparkinsonian rat does not impair the survival of grafted dopaminergic neurones", *Exp Neurol* 156, 205-8 (1999)
48. Dunnett, S. B., "Repair of the damaged brain. The Alfred Meyer Memorial Lecture 1998", *Neuropathol Appl Neurobiol* 25, 351-62 (1999)
49. Barker, R. A. and Dunnett, S. B., "Functional integration of neural grafts in Parkinson's disease", *Nat Neurosci* 2, 1047-8 (1999)
50. Winkler, C., Kirik, D., Bjorklund, A. and Dunnett, S. B., "Transplantation in the rat model of Parkinson's disease: ectopic versus homotopic graft placement", *Prog Brain Res* 127, 233-65 (2000)

51. Dunnett, S. B., Bjorklund, A. and Lindvall, O., "Cell therapy in Parkinson's disease - stop or go?" *Nat Rev Neurosci* 2, 365-9 (2001)
52. Brundin, P., Dunnett, S., Bjorklund, A. and Nikkhah, G., "Transplanted dopaminergic neurons: more or less?" *Nat Med* 7, 512-3 (2001)
53. Hurelbrink, C. B., Armstrong, R. J., Luheshi, L. M., Dunnett, S. B., Rosser, A. E. and Barker, R. A., "Death of dopaminergic neurons in vitro and in nigral grafts: reevaluating the role of caspase activation", *Exp Neurol* 171, 46-58 (2001)
54. Murphy, M. B., "Dopamine: a role in the pathogenesis and treatment of hypertension", *J Hum Hypertens* 14 Suppl 1, S47-50 (2000)
55. Gelinas, S., Chapados, C., Beauregard, M., Gosselin, I. and Martinoli, M. G., "Effect of oxidative stress on stability and structure of neurofilament proteins", *Biochem Cell Biol* 78, 667-74 (2000)
56. Itano, Y., Kitamura, Y. and Nomura, Y., "1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-induced cell death in PC12 cells: inhibitory effects of several drugs", *Neurochem Int* 25, 419-24 (1994)
57. Fall, C. P. and Bennett, J. P., Jr., "Characterization and time course of MPP+ - induced apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells", *J Neurosci Res* 55, 620-8 (1999)
58. Vohradsky, J. and Panek, J., "Quantitative analysis of gel electrophoretograms by image analysis and least squares modeling", *Electrophoresis* 14, 601-12 (1993)
59. Marquardt, D., *Journal of the society of Industrial and Applied Mathematics* 11, 431-41 (1963)
60. Roth, R., Wolf, M. and Deutch, A., "Series", *In Psychopharmacology: the third generation of progress*, 3rd Edition, Raven Press, (1987)
61. Ara, J., Przedborski, S., Naini, A. B., Jackson-Lewis, V., Trifiletti, R. R., Horwitz, J. and Ischiropoulos, H., "Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)", *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7659-63 (1998)
62. Petrie, E. C., Veith, R. C. and Szot, P., "Bupropion and desipramine increase dopamine transporter mRNA expression in the ventral tegmental area/substantia

- nigra of rat brain", *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 22, 845-56 (1998)
63. Chatterjee, T. K., Scott, C. E., Vazquez, D. M. and Bhatnagar, R. K., "Interaction of [³H]spiperone with rat striatal dopamine D-2 receptors: kinetic evidence for antagonist-induced formation of ternary complex", *Mol Pharmacol* 33, 402-13 (1988)