

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	ix
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 La maladie de Parkinson	1
1.1.1 Historique de la maladie de Parkinson	1
1.1.2 Épidémiologie de la MP	2
1.2 Les symptômes de la MP	3
1.2.1 Les symptômes moteurs.....	4
1.2.2 Les symptômes non-moteurs	5
1.3 Le contrôle moteur dans la MP	7
1.3.1 La voie nigro-striée.....	8
1.4 La physiopathologie de la MP	12
1.4.1 La perte de la pigmentation de la SNpc.....	12
1.4.2 Présence de corps de Lewy (CL).....	13
1.5 L'étiologie de la MP.....	14
1.5.1 La MP d'origine génétique	14
1.5.2 La MP idiopathique	17
1.6 Modèles d'étude de la MP	29
1.6.1 Le MPTP (et le MPP ⁺).....	29
1.6.2 La 6-hydroxydopamine (6-OHDA)	31
1.6.3 Autres toxines	31
1.6.4 La co-culture cellulaire : un modèle d'étude de la neuroinflammation..	32
1.7 Traitements de la MP	35
1.7.1 Les traitements pharmacologiques.....	35
1.7.2 Les traitements chirurgicaux.....	36

1.8	Stratégies de prévention de la MP par l'utilisation de molécules antioxydantes	37
1.8.1	Le trans-resvératrol (resvératrol)	37
1.8.2	Le trans- ϵ -viniférine (ϵ -viniférine)	42
1.9	Hypothèses et objectifs de recherche	45
CHAPITRE II		
MATÉRIEL ET MÉTHODES		47
2.1	Culture cellulaire	47
2.2	Traitements cellulaires	50
2.3	Mesure de la mortalité et de la survie cellulaire	51
2.4	Détection de l'apoptose par microscopie à fluorescence	53
2.5	Immunobuvardage de type «Western»	54
2.6	Analyses statistiques	55
CHAPITRE III		
RÉSULTATS		56
3.1	Rétrospective des expérimentations effectuées dans ce mémoire.....	56
3.2	Dose-réponse de l'effet neuroprotecteur d' ϵ -viniférine sur les neurones PC12 .	57
3.3	L' ϵ -viniférine, seule ou en combinaison avec le resvératrol, diminue le taux de neurones PC12 apoptotiques.....	61
3.4	L' ϵ -viniférine seule ou en combinaison avec le resvératrol diminue le niveau des protéines indicatrices de l'apoptose Caspase-3 clivée et PARP-1 clivée dans des neurones PC12 traitées à la 6-OHDA	63
3.5	L' ϵ -viniférine seule ou utilisée en combinaison avec le resvératrol baisse le potentiel inflammatoire de microglies N9 activées dans un contexte de co-culture microglie-neurone.....	65
3.6	Évaluation de l'effet anti-apoptotique d'un prétraitement avec de l' ϵ -viniférine seule ou utilisée en combinaison avec le resvératrol sur des microglies N9 activées dans une co-culture microglie-neurone.....	66
3.7	L' ϵ -viniférine seule ou utilisée en combinaison avec le resvératrol protège les neurones PC12 de la cytotoxicité induite par des microglies N9 activées dans une co-culture microglie-neurone.....	67
CHAPITRE IV		
DISCUSSION		69

CHAPITRE V	
CONCLUSION.....	76
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	78

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Prévalence et incidence mondiale de la MP selon l'âge et le sexe	3
1.2	Posture d'un patient parkinsonien.....	5
1.3	Les quatre voies neuronales DAergiques.....	8
1.4	Coupe frontale du cerveau illustrant les composantes de la voie nigro-striée.....	9
1.5	Voie nigro-striée directe (A) ainsi que son interaction avec la voie indirecte (B)	11
1.6	La voie nigro-striée chez un patient parkinsonien	12
1.7	Pigmentation de la NM entre la SNpc d'un cerveau sain (gauche) et la SNpc d'un cerveau parkinsonien (droite)	13
1.8	Marquage immunohistochimique de neurones DAergiques de la SNpc, observés au microscope électronique.....	14
1.9	Synthèse des mutations dans la MP génétique	15
1.10	Illustration du déséquilibre causant le stress oxydatif	17
1.11	Relation entre le stress oxydatif et l'apoptose	19
1.12	Création de ROS via l'oxydation de la DA et la réaction de Fenton	21
1.13	Mécanismes d'action des enzymes antioxydantes de la cellule.....	22
1.14	Représentation schématisée de la BHE.....	23
1.15	Facteurs favorisant l'état de repos de la microglie	24
1.16	Facteurs favorisant l'activation microgliale.....	25
1.17	Illustration de l'évolution de la morphologie microgliale pendant son activation (de gauche à droite).....	26
1.18	Implication des microglies activées dans la mort des neurones DAergiques	27

1.19	Schématisation de l'influence de la neuroinflammation dans la destruction neuronale dopaminergique.....	29
1.20	Transformation du MPTP en MPP ⁺	30
1.21	Entrée du MPTP (A) et mécanismes d'action du MPP ⁺ (B) à l'intérieur de neurones DAergiques.....	30
1.22	Structure de la 6-OHDA	31
1.23	Mode d'action des principales toxines utilisées dans l'étude de la MP.....	32
1.24	Insert utilisé pour la co-culture (A) et schématisation de la co-culture cellulaire (B).	33
1.25	Mécanisme d'activation de la microglie par le LPS	33
1.26	Métabolisme de la dopamine.	35
1.27	Structure du trans-resvératrol.....	38
1.28	Mécanismes d'action du resvératrol dans la microglie.....	41
1.29	Structure du Trans- ϵ -viniférine.....	42
1.30	Effet neuroprotecteur de l' ϵ -viniférine dans un modèle cellulaire de la MH.....	44
2.1	Les cellules PC12 non différenciées (A) et différenciées (B) suite à l'ajout de NGF (40x, lumière blanche).	47
2.2	Les cellules PC12 différenciées présentent les marqueurs typiques des neurones DAergiques (40x, immunofluorescence).....	48
2.3	Le système de co-culture microglie-neurone.....	49
2.4	Réaction colorimétrique pour déterminer l'activité de la LDH afin d'évaluer la mortalité cellulaire.	52
2.5	Réaction colorimétrique de réduction du MTT utilisée pour évaluer la survie cellulaire.	53
3.1	Dosage de la mort cellulaire par test LDH de neurones PC12 prétraités 3 heures avec du milieu de traitement PC12 ou de l' ϵ -viniférine seule ou mélangée avec du resvératrol puis traités 24 heures avec de la 6-OHDA ou du milieu de traitement PC12.	59

3.2	Dosage de la survie cellulaire par test MTT de neurones PC12 prétraitées 3 heures avec du milieu de traitement PC12 de l'ε-viniférine seule ou mélangée avec du resvératrol, puis traitées 24 heures avec de la 6-OHDA ou du milieu de traitement PC12.	60
3.3	Détection par immunofluorescence de l'apoptose (A) et taux de cellules apoptotiques (B) de neurones PC12 prétraitées avec du milieu de traitement PC12, de l'ε-viniférine seule ou mélangée avec du resvératrol, puis traitées avec de la 6-OHDA ou du milieu de traitement PC12.	63
3.4	Ratio des protéines indicatrices de l'apoptose Caspase-3 clivée (A) et PARP-1 clivée (B) dans des neurones PC12 prétraitées 3 heures avec du milieu de traitement PC12 ou de l'ε-viniférine seule ou mélangée avec du resvératrol, puis traitées 24 heures avec de la 6-OHDA ou du milieu de traitement PC12.	64
3.5	Dosage, par le test LDH, de la mort cellulaire de neurones PC12 mis en co-culture avec des microglies N9 prétraitées 3 heures avec du milieu de traitement N9 ou de l'ε-viniférine seule ou mélangée avec du resvératrol puis activées 24 heures au LPS ou du milieu de traitement N9.	66
3.6	Détection par immunofluorescence de l'apoptose de neurones PC12 mis en co-culture avec des microglies N9 prétraitées 3 heures avec du milieu de traitement N9 ou de l'ε-viniférine seule ou mélangée avec du resvératrol puis activées 24 heures au LPS ou au milieu de traitement N9 ..	67
3.7	Dosage, par test LDH, de la mort cellulaire de neurones PC12 prétraitées 3 heures avec du milieu de traitement PC12 ou de l'ε-viniférine seule ou mélangée avec du resvératrol puis mises en co-culture avec des microglies N9 activées 24 heures au LPS ou du milieu de traitement N9.	68

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

6-OHDA	6-hydroxydopamine
AA	Acide Arachidonique
AIF	Facteur induisant l'apoptose
AMPK	«AMP-activated protein kinase»
BDNF	«Brain derived neurotrophic factor»
BHE	Barrière hémato-encéphalique
Cat	Catalase
CL	Corps de Lewy
COX-2	Cyclo-oxygénase 2
cPLA2	Phospholipase A2 cytosolique
DA	Dopamine
DAT	Transporteur de la dopamine
DBS	«Deep brain stimulation»
DDC	Dopa décarboxylase
DMEM-F12	«Dulbecco's modified eagle's medium F12»
E2	Oestradiol
ϵ -viniférine	Trans-epsilon-viniférine
FBS	Sérum bovin foetal
FSGB	«Fish skin gelatin buffer»
GDNF	«Glial cell line derived neurotrophic factor»
GPe	Globus pallidus externe
GPi	Globus pallidus interne
GPX	Glutathion peroxydase

GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HS	Sérum de cheval
Htt	Huntingtine
IFN- γ	Interféron gamma
I κ B	Inhibiteur du facteur nucléaire κ B
IL-1	Interleukine 1
IL-1 β	Interleukine 1 bêta
IL-6	Interleukine 6
IL-10	Interleukine 10
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
L-dopa	Lévodopa
LDH	Lactate déshydrogénase
LKB	«Liver kinase B»
LPS	Lipopolysaccharide
MA	Maladie d'Alzheimer
MAO-B	Monoamine oxydase B
MD-2	Protéine de différenciation myéloïde 2
MH	Maladie de Huntington
MP	Maladie de Parkinson
MPTP	Méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

NF	Neurofilament
NF- κ B	Facteur nucléaire κ B
NGF	Facteur de croissance neuronal
NM	Neuromélanine
NO	Oxyde nitrique
NOS	Espèce réactive de l'azote
NST	Noyau sous-thalamique
$O_2^{\bullet -}$	Ion superoxyde
OH \bullet	Radical hydroxyl
ONOO $^-$	Peroxynitrite
PBS	«Phosphate buffer saline»
PGE	Prostaglandine E
PQ	Paraquat
PRR	«Pattern recognition receptor»
Resvératrol	Trans-resvératrol
ROS	Espèce réactive de l'oxygène
RPMI-1640	«Roswell Park Memorial Institute 1640»
SIRT1	Sirtuine 1
SIRT3	Sirtuine 3
SOD	Superoxyde dismutase
SNpc	Substance noire <i>pars compacta</i>
TBS	«Tris buffer saline»
TBST	«Tris buffer saline and tween 20»
TGF- β	Facteur de croissance transformant bêta
TH	Tyrosine hydroxylase

TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
TNF- α	Facteur de nécrose tumoral alpha
TNFR	Récepteur de TNF- α
TRAF	Facteurs associés à TNFR
VEC	Cellules vasculaires endothéliales
WB	Immunobuvardage de type «Western»

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 La maladie de Parkinson

1.1.1 Historique de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est un désordre neurodégénératif qui a été observé de nombreuses fois dans l'histoire de l'humanité. En effet, certaines sources datant de 1000 ans avant Jésus Christ provenant d'Inde et de Chine décrivaient déjà des symptômes apparentés à la MP [1,2], tandis que plus récemment, des observations de tremblements au repos ou de festination (marche boiteuse avec de petits pas) ont été relatées au 16^e et au 17^e siècle [3,4]. Cependant, cette maladie a été décrite officiellement pour la première fois en 1817 par le Dr James Parkinson dans un essai intitulé «An essay on the Shaking Palsy» qui présente l'étude de six cas caractérisant la MP par «des mouvements involontaires comprenant des tremblements; une force musculaire diminuée dans les parties du corps au repos, une tendance à courber le tronc vers l'avant même avec un soutien et le passage de la marche à la course sans atteintes aux sens ni à l'intellect» [5]. Une cinquantaine d'années plus tard, le Dr Jean-Martin Charcot (à qui on doit la découverte de la sclérose latérale amyotrophique) a complété les conclusions de James Parkinson en observant un «ralentissement de l'accomplissement des mouvements, sans affaiblissement de la force motrice» [6]. C'est donc suite aux observations de Parkinson et Charcot que les symptômes de la MP ont été décrits et que la «triade symptomatique», outil diagnostique encore utilisé de nos jours a été caractérisée. La triade symptomatique, qui sera décrite plus en détails à la section 1.2.1, est : le tremblement des membres au repos, la bradykinésie et l'hypertonie.

Bien que la découverte de la MP date d'il y a près de deux siècles, c'est Hornykiewicz qui a émis l'hypothèse d'un lien entre les symptômes et la perte du neurotransmetteur dopamine (DA). En effet, des études *post-mortem* de cerveaux de patients parkinsoniens ont démontré que des structures comme le noyau caudé et le putamen possédaient un taux de dopamine plus bas que dans les cerveaux sains et de plus que cette baisse pouvait être engendrée par une destruction des neurones de la substance noire *pars compacta* (SNpc) qui projettent vers le noyau caudé et le putamen [7]. Les causes de cette mort neuronale ne sont pas complètement élucidées, ce qui complique la prévention et le traitement de cette maladie.

1.1.2 Épidémiologie de la MP

Chez les personnes âgées de plus de 60 ans vivant dans les pays développés, la MP est la 2^e maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer (MA). De récentes études épidémiologiques montrent que la MP a une incidence de 10 à 50 nouveaux cas par tranche de 100 000 personnes par année [8], alors que sa prévalence se situe entre 100 à 300 cas existants par tranche de 100 000 habitants [9]. Tel qu'illustré par la figure 1.1, l'incidence et la prévalence de la MP augmentent avec l'âge. En effet, on y observe une prévalence dix fois plus élevée dans la tranche d'âge 70-79 ans (1087 par 100 000 personnes) que dans la tranche d'âge 50-59 ans (107 par 100 000 personnes) [9]. Avec le vieillissement attendu de la population mondiale, la MP représente un enjeu de santé publique grandissant, les dernières estimations prédisant même qu'en 2030 le nombre de cas pourrait avoir doublé [10].

L'incidence de la MP est influencée par plusieurs facteurs tels que : l'ethnie, la présence chronique à des toxines environnementales ou une susceptibilité génétique [11]. De plus, il est intéressant de noter que la MP touche 1,5 fois plus d'hommes que de femmes, une différence pouvant être expliquée entre autres par la neuroprotection due à la présence d'estrogène ou certains

facteurs génétiques reliés au chromosome X [12,13]. La MP présente donc une grande complexité du point de vue étiologique et épidémiologique.

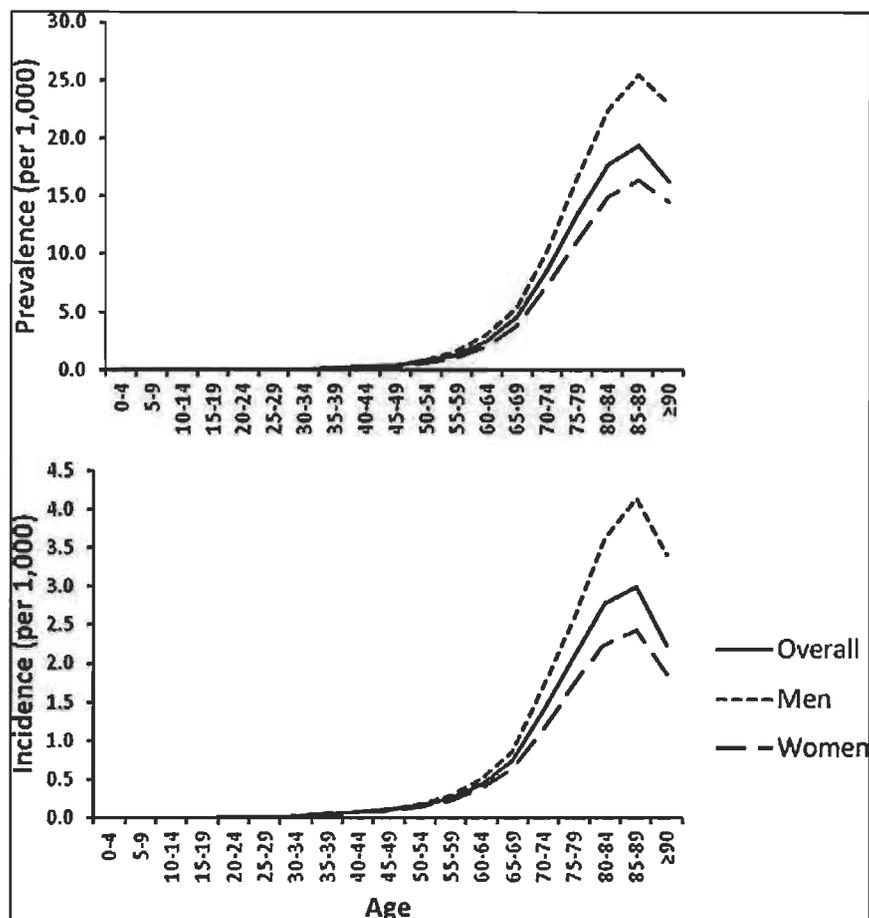


Figure 1.1 Prévalence et incidence mondiale de la MP selon l'âge et le sexe [14].

1.2 Les symptômes de la MP

La MP présente plusieurs symptômes qui sont classés en symptômes moteurs et en symptômes non-moteurs. L'apparition de ces symptômes débute lorsque la perte de neurones DAergiques est supérieure à 50 %, selon certaines sources cliniques [15]. Cette destruction neuronale cause, par la suite, une diminution du taux de DA dans une des voies principales du control moteur, la voie nigro-striée. La perte de DA engendre d'autres dérèglements de neurotransmetteurs a plusieurs niveaux jusqu'à provoquer des déficits moteurs

périphériques, ainsi que des déficits non-moteurs, qui sont moins connus. Il est important d'indiquer que la maladie n'évolue pas à la même vitesse d'un individu à un autre et qu'il n'est pas nécessaire d'avoir tous les symptômes pour recevoir le diagnostic [16]. En effet, la présence de deux symptômes moteurs suffit pour avoir un diagnostic probable [17]. Le terme probable est utilisé, car à ce jour, il n'existe pas de marqueur cellulaire fiable de la MP, l'analyse *post-mortem* étant présentement le seul moyen d'établir un diagnostic définitif de la MP.

Les manifestations physiopathologiques sont présentées à la section 1.3 de ce mémoire.

1.2.1 Les symptômes moteurs

Le premier symptôme de la triade parkinsonienne est le tremblement au repos, le plus souvent de la tête et les membres supérieurs, plus précisément au niveau du pouce et du poignet. C'est avec ce symptôme que plusieurs parkinsoniens débiteront la maladie [18] et au début, les tremblements peuvent s'atténuer lorsqu'un mouvement volontaire est amorcé. Comme il a été expliqué précédemment, ce n'est pas tous les parkinsoniens qui auront ce symptôme. En effet, le quart d'entre eux l'auront au cours de leur vie [19].

Le deuxième symptôme de la triade parkinsonienne est la bradykinésie c'est-à-dire l'augmentation du temps requis pour exécuter un mouvement. Ce problème peut aussi être associé à une diminution de l'amplitude du mouvement, appelée hypokinésie. À mesure que la maladie progresse, cette bradykinésie peut évoluer en akinésie qui est caractérisée par une incapacité à initier tout mouvement volontaire. Lorsque cette akinésie est associée à des tremblements au repos, il devient très difficile de combattre ces derniers et la plus simple des tâches manuelles devient ardue et cause rapidement une fatigue constante chez le parkinsonien. Cette fatigue, peut pousser le patient à écrire plus petit et à adopter une expression faciale et une voix plus monotones [15,20].

Le troisième symptôme de la triade parkinsonienne est l'hypertonie, c'est-à-dire la rigidité musculaire. Ce problème est caractérisé par une incapacité du muscle à revenir à sa position relâchée et donc, il reste constamment en position contractée. Chez le parkinsonien, cette rigidité est souvent située au niveau de la colonne vertébrale et de la base des membres, causant des douleurs dans le dos, la nuque et les épaules. Ces manifestations, associées à l'akinésie, amènent le patient à adopter une position du corps penché vers l'avant avec des membres courbés et collés à proximité du corps, tel que montré à la figure 1.2. Cette instabilité posturale pousse le parkinsonien à se déplacer par coups et amène son centre de gravité vers l'avant, ce qui oblige à raccourcir et accélérer le pas, ce qu'on appelle la festination.



Figure 1.2 Posture d'un patient parkinsonien [21].

1.2.2 Les symptômes non-moteurs

Moins connus que les symptômes moteurs, les symptômes non-moteurs de la MP font tout autant partie de cette maladie. Ils peuvent apparaître à n'importe quel stade de la MP. Ces symptômes sont divisés en troubles neuropsychiatriques, en troubles du sommeil, en troubles autonomiques et en problèmes sensitifs.

1.2.2.1 Troubles neuropsychiatriques

Ces troubles incluent principalement la dépression, l'anxiété, l'apathie, ainsi que la démence [22]. La dépression affecte plus de 45 % des patients parkinsoniens [23]. L'anxiété se manifeste par des crises de panique ou une phobie sociale et est souvent associée à d'autres troubles du même type comme la dépression [24]. L'apathie peut se produire en présence ou en absence de dépression [25]. Pour la démence, elle survient surtout en âge avancé et touche environ huit parkinsoniens sur dix [26].

1.2.2.2 Troubles du sommeil

Environ 65 % des patients atteints de la MP auront un trouble au sommeil au cours de leur vie [27,28]. Le principal problème de sommeil présent chez les parkinsoniens est l'insomnie, plus spécifiquement une difficulté à s'endormir. D'autres troubles du sommeil, moins fréquents, peuvent se produire; il y a par exemple le syndrome des jambes sans repos et des troubles comportementaux lors du sommeil paradoxal [25].

1.2.2.3 Troubles autonomiques

Ces problèmes, dont l'apparition et la fréquence varient grandement d'un patient parkinsonien à l'autre, touchent principalement le système urinaire, le système digestif et le comportement sexuel. Dans le cas du système urinaire, on peut observer une hyperactivité du muscle détrusor de la vessie rendant la miction plus fréquente. À l'inverse, les parkinsoniens bradykinétiques peuvent avoir un problème de contraction de la vessie ou du sphincter urinaire rendant difficile l'action d'uriner [29]. Pour le système digestif, les troubles sont souvent associés à un ralentissement des fonctions digestives pouvant mener à de la constipation ou encore à des problèmes de déglutition menant à de l'hypersalivation chronique [30]. Dans le cas du comportement sexuel, on remarque quelques fois des épisodes d'hypersexualité [31].

1.2.2.4 Troubles sensitifs

Chez les parkinsoniens, les troubles sensitifs se traduisent principalement par de la douleur diffuse et des déficits au niveau des sens, principalement la vue et l'odorat. Les problèmes olfactifs touchent jusqu'à neuf parkinsoniens sur dix [32]. La douleur, autant superficielle que viscérale, peut toucher plusieurs parties du corps, dont le visage, les membres et l'appareil musculo-squelettique [25]. Concernant les problèmes visuels, il s'agit souvent d'un problème à discerner les couleurs ainsi que leur contraste [33].

1.3 Le contrôle moteur dans la MP

Les neurones DAergiques représentent la population cellulaire principalement touchée lors de la MP et ils se situent à plusieurs endroits dans le cerveau, formant des voies de communication utilisant la DA. Il existe quatre voies DAergiques : la voie méso-limbique, la voie méso-corticale, la voie tubéro-infundibulaire et la voie nigro-striée, qui sont illustrées à la figure 1.3. La voie nigro-striée est la plus touchée dans la MP et sera décrite plus en détail dans la prochaine section. La voie méso-limbique relie les neurones innervant l'aire tegmentaire ventrale aux neurones qui constituent le système limbique. Cette voie est primordiale pour la consolidation de la mémoire ainsi que la motivation qui se retrouve derrière nos actions. La voie méso-corticale innerve l'aire tegmentaire ventrale et le cortex frontal. Sans cette voie, nous aurions de la difficulté à nous concentrer ainsi qu'à exécuter des tâches simples. Finalement, la voie tubéro-infundibulaire relie l'hypothalamus et l'hypophyse, deux glandes dont la relation est primordiale dans le bon fonctionnement du système endocrinien.

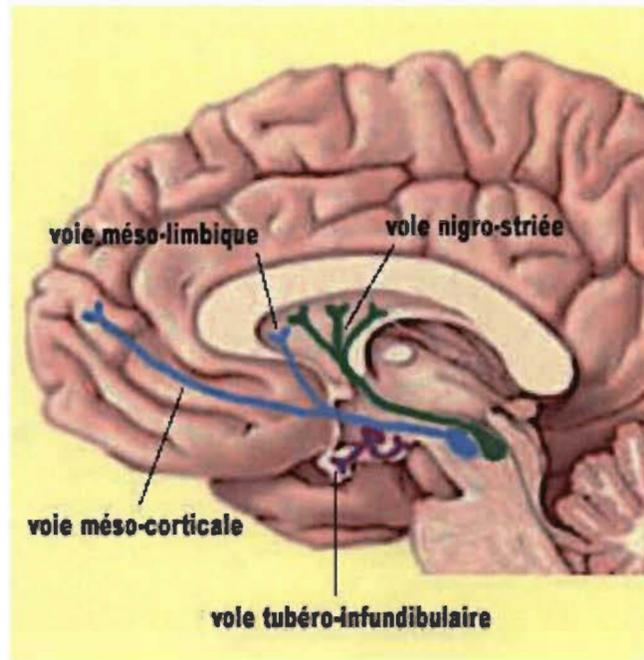


Figure 1.3 Les quatre voies neuronales DAergiques [34].

1.3.1 La voie nigro-striée

La voie nigro-striée est une boucle rétroactive qui a pour fonction l'initiation et le contrôle de la motricité grâce un système complexe de signaux d'activation et d'inhibition coordonnés par les noyaux gris centraux. Ces noyaux sont au nombre de quatre : le striatum (constitué du noyau caudé et du putamen), le globus pallidus (sous divisé en globus pallidus interne (GPi) et externe (GPe)), le noyau sous-thalamique (NST) et la substance noire (divisé en *pars compacta* et en *pars reticulata*), tel qu'illustré à la figure 1.4.

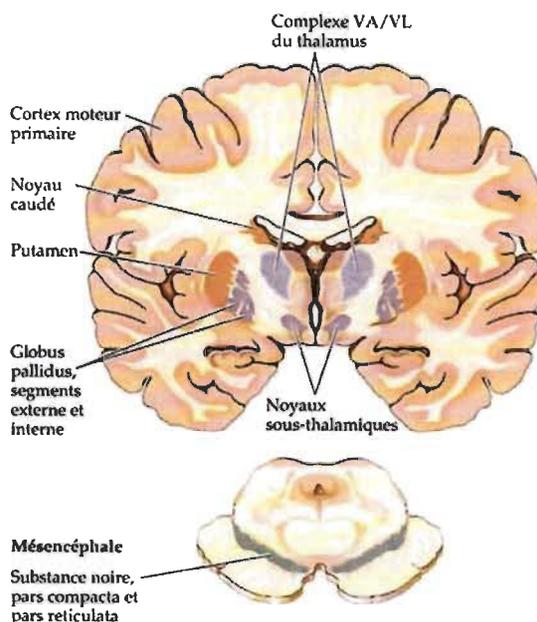


Figure 1.4 Coupe frontale du cerveau illustrant les composantes de la voie nigro-striée [35].

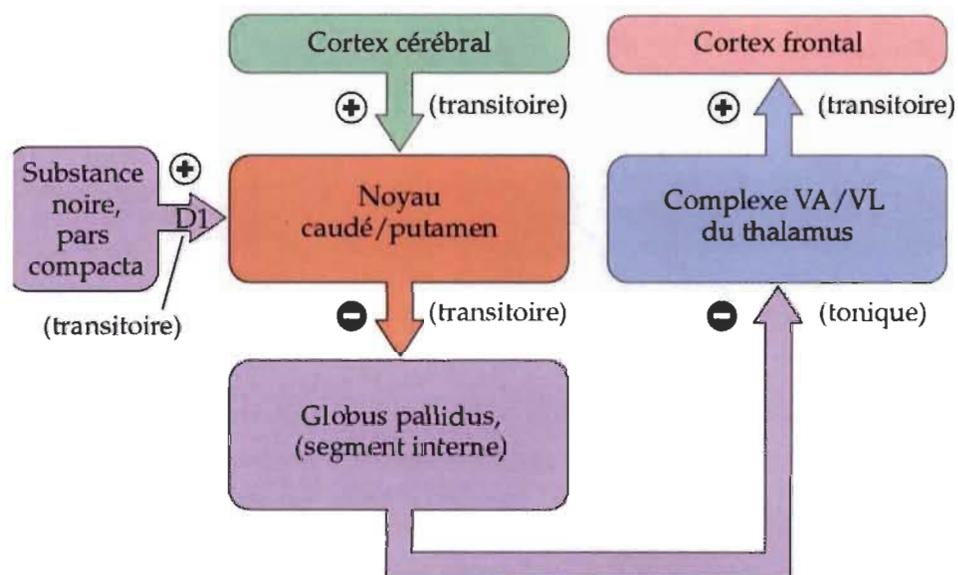
La voie nigro-striée est constituée d'une voie directe et d'une voie indirecte. Dans la voie directe, lorsqu'un mouvement est initié, le cortex prémoteur et la SNpc envoient des projections activatrices vers le striatum. Lorsque le striatum est activé, il inhibe le GPi qui, lorsqu'il fonctionne normalement, exerce une inhibition constante sur le thalamus qui ne peut alors pas communiquer avec le cortex moteur. Donc l'inhibition du GPi par le striatum permet au thalamus d'envoyer des projections activatrices vers le cortex prémoteur, qui peut à son tour envoyer des projections à la moelle épinière qui va interagir avec le muscle pour initier et contrôler le mouvement voulu. Cette voie nigro-striée est illustrée plus en détail à la figure 1.5A.

Dans le cas de la voie nigro-striée indirecte, qui sert d'antagoniste à la voie directe, des projections activatrices du cortex prémoteur et des projections inhibitrices de la SNpc visant des récepteurs DAergiques différents (D2) amènent le striatum à inhiber le GPe, qui normalement, inhibe le NST, empêchant l'activation du GPi. Ainsi, lorsque le striatum inhibe le GPe, ce dernier ne peut plus exercer son inhibition sur le NST, permettant l'activation du GPi et donc

l'inhibition du thalamus de façon tonique, empêchant l'initiation du mouvement. De plus, le cortex prémoteur peut envoyer des projections activatrices vers le NST, cette voie, servant de frein à la voie directe, tel qu'illustré à la figure 1.5B.

Chez un patient parkinsonien, comme il y a une perte des neurones DAergiques de la SNpc, le striatum perd une partie de ses afférences, ce qui diminue son influence inhibitrice sur le GPi (dans la voie directe) et augmente son effet inhibiteur sur le GPe (dans la voie indirecte). Le GPi peut donc plus facilement inhiber le thalamus et le GPe inhibe plus difficilement le NST, permettant d'augmenter son influence excitatrice sur le GPi. Ces deux voies convergent alors et augmentent grandement l'influence inhibitrice du GPi sur le thalamus, rendant plus difficile l'excitation du cortex prémoteur et l'initiation du mouvement. Ces changements sont illustrés à la figure 1.6.

(A) Voie directe



(B) Voies indirecte et directe

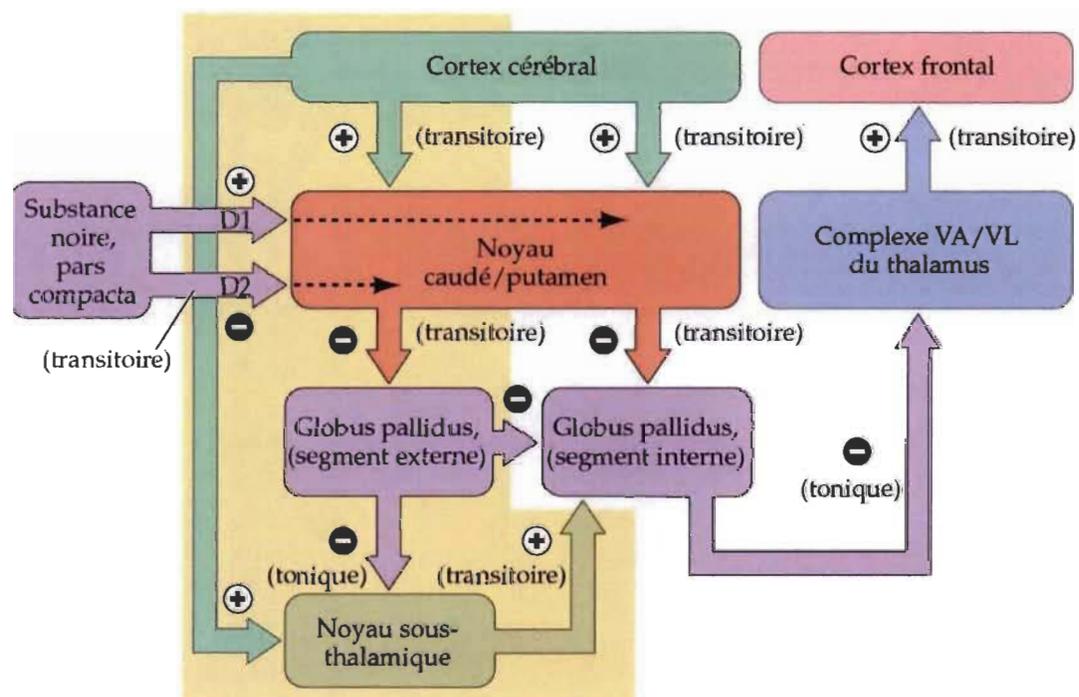


Figure 1.5 Voie nigro-striée directe (A) ainsi que son interaction avec la voie indirecte (B) [35].

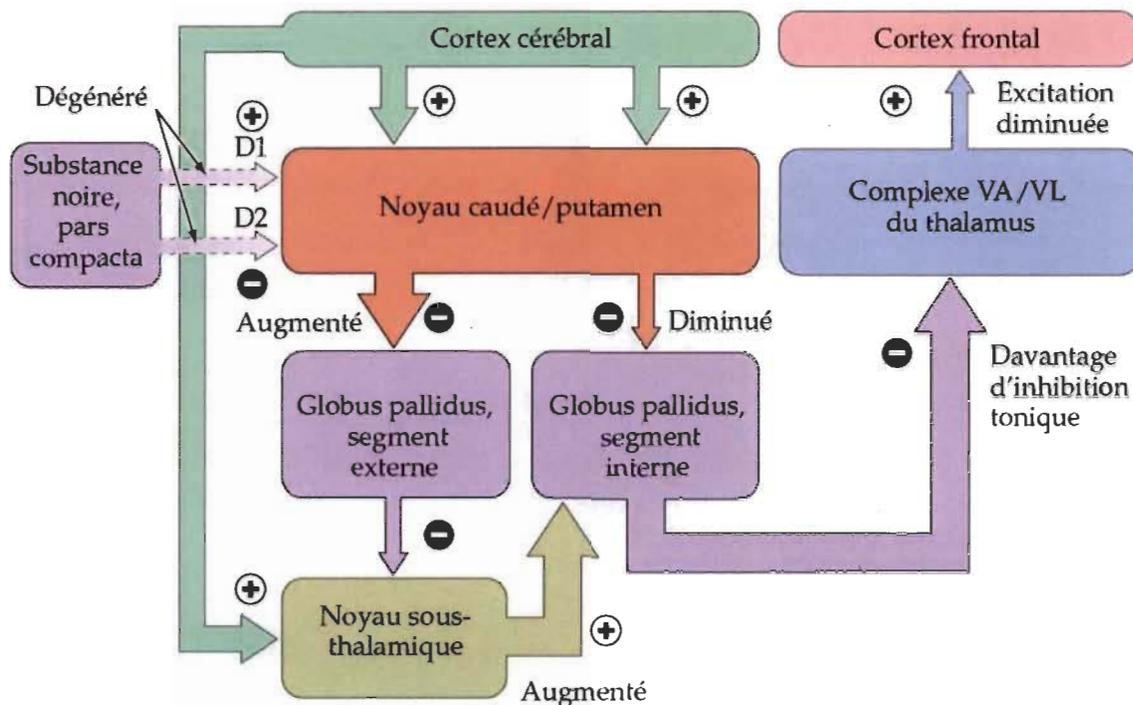


Figure 1.6 La voie nigro-striée chez un patient parkinsonien [35].

1.4 La physiopathologie de la MP

1.4.1 La perte de la pigmentation de la SNpc

La substance noire tient son nom de la présence d'un pigment de couleur brun-noir provenant du métabolisme de la DA, la neuromélanine (NM) [36]. Sa présence dans le cytosol a comme rôle principal de protéger les neurones d'une trop grande toxicité par différents mécanismes. En outre, la NM aide à stabiliser les niveaux de DA et elle se lie à des composés toxiques comme l'ion fer, empêchant la production d'espèces réactives de l'oxygène [37]. Ces mécanismes seront expliqués à la sous-section 1.5.2. Dans la MP, la perte de cette pigmentation sert de marqueur cellulaire *post-mortem* (Figure 1.7) afin de confirmer le diagnostic de la maladie.

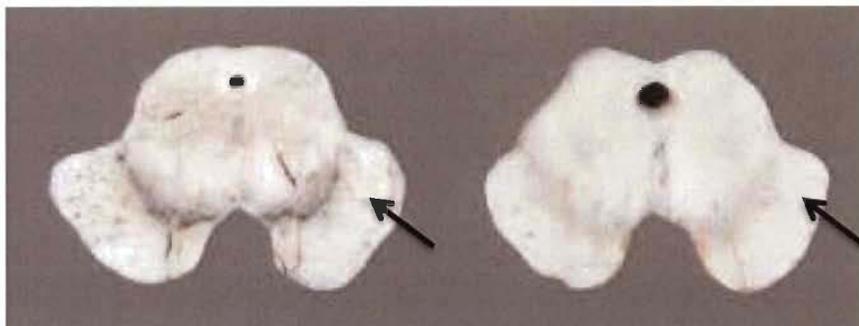


Figure 1.7 Pigmentation de la NM entre la SNpc d'un cerveau sain (gauche) et la SNpc d'un cerveau parkinsonien (droite) [38].

1.4.2 Présence de corps de Lewy (CL)

Les CL, découverts en 1912 par le neuroanatomiste allemand Friedrich Heinrich Lewy, sont des amas arrondis de protéines éosinophiles dans le cytoplasme des neurones, tel qu'illustré à la figure 1.8 [39,15]. Ces corps sont majoritairement composés d' α -synucléine, mais ils peuvent aussi contenir de l'ubiquitine, de la parkine et des neurofilaments [15,40]. La création de ces agrégats de protéines serait principalement due à des mutations de gènes et des modifications post-traductionnelles de protéines qui seront présentés à la sous-section 1.5.1 [41]. Bien que pendant le vieillissement les CL puissent se localiser dans les régions plus frontales du système nerveux central, dans un contexte de MP, ils présentent une localisation plus spécifique au niveau de la SNpc [42].

Des analyses *post-mortem* de cerveaux parkinsoniens indiquent que la quasi-totalité des patients de la MP présentent des CL dans la SNpc [43,44]. À l'inverse, la présence de CL dans d'autres régions cérébrales n'est pas nécessairement indicatrice de la MP ou de tout autre désordre neurologique. En effet, chez les 65 ans et plus, 15 % auront des CL sans qu'ils montrent les signes d'une maladie neurodégénérative [18]. De plus, ce marqueur se retrouvant aussi chez des patients atteints de la MA ou de la démence avec CL, il ne peut pas être utilisé comme marqueur spécifique de la MP.

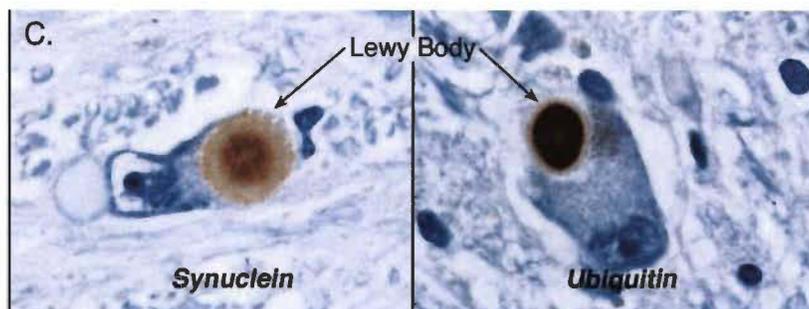


Figure 1.8 Marquage immunohistochimique de neurones DAergiques de la SNpc, observés au microscope électronique. Le marquage des corps de Lewy (marqués par une flèche) a été fait avec un anticorps anti- α -synucléine (gauche) ou anti-ubiquitine (droite) [15].

1.5 L'étiologie de la MP

Depuis sa découverte par James Parkinson en 1817, beaucoup de connaissances sur les mécanismes cellulaires impliqués dans la MP ont été recueillies et ont permis une meilleure compréhension globale du fonctionnement de notre système nerveux. Cependant, dans ce casse-tête que représente la MP, il nous manque encore une pièce cruciale, la cause de cette maladie. En effet, seulement 5 % des cas de MP sont de nature génétique, la quasi-totalité étant de nature idiopathique [15]. Cette section traitera brièvement des principaux gènes qui sont impliqués dans la MP. Ensuite, les hypothèses courantes concernant le développement des cas idiopathiques seront présentées.

1.5.1 La MP d'origine génétique

Chez les patients atteints d'une forme génétique de la MP, la maladie survient beaucoup plus précocement que pour les cas sporadiques, souvent même avant l'âge de 50 ans. Ces cas résultent de mutations causant un dysfonctionnement de certaines protéines, qui créent alors des agrégats entravant le bon fonctionnement de la cellule jusqu'à entraîner un stress oxydatif toxique [45]. Depuis la fin des années 90, quatre gènes ont retenu l'attention des chercheurs [46]. L'action de ces gènes et ces protéines est illustrée à la figure 1.9.

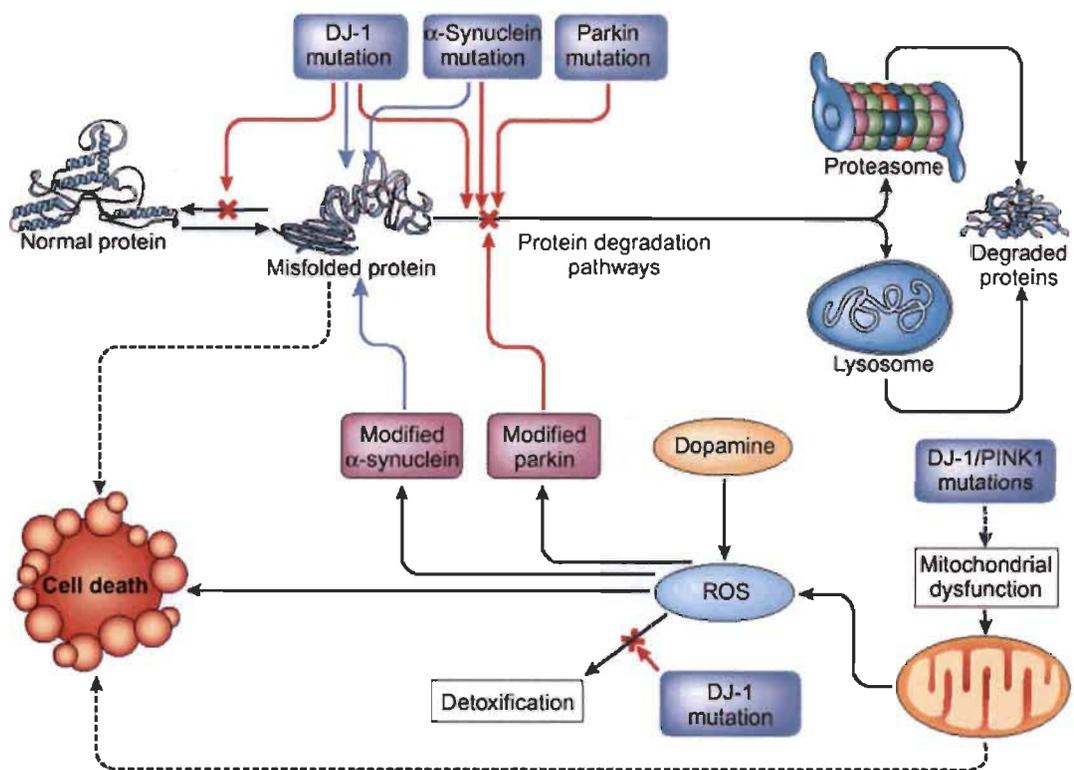


Figure 1.9 Synthèse des mutations dans la MP génétique [59].

1.5.1.1 Le gène codant pour l' α -synucléine (*PARK1*)

Retrouvé abondamment dans le système nerveux, l' α -synucléine est une protéine possédant plusieurs rôles : transport des neurotransmetteurs, plasticité neuronale et dynamisme membranaire [15,38]. Mais, l' α -synucléine, lorsqu'elle est traduite à partir de son gène muté, est également le constituant principal des CL, décrits à la sous-section 1.4.2. Les principales modifications du gène codant pour cette protéine sont des mutations anti-sens (A53T, A30P and E46K) qui modifient la fonction de la protéine [47-49]. De plus, des chercheurs ont observé une corrélation entre une triplication d'un locus du gène de l' α -synucléine et la MP [50]. La protéine mutée se retrouve sous une forme intermédiaire insoluble et plissée, provoquant dans le neurone une accumulation toxique et un blocage du transport intracellulaire [45,51].

1.5.1.2 Le gène codant pour la parkine (PARK2)

La parkine est une ubiquitine E3 ligase qui est normalement responsable de la destruction de certaines protéines par le système ubiquitine-protéasome [45]. Lorsqu'elle est mutée, moins d'éléments indésirables de la cellule sont dégradés, provoquant une accumulation protéinique toxique pour le neurone [52,53]. Comme il a été expliqué à la sous-section 1.4.2, la parkine peut aussi s'associer à l' α -synucléine pour former des CL [54]. De toutes les formes génétiques de la MP, la majorité est causée par une mutation dans le gène de la parkine [52].

1.5.1.3 Le gène codant pour PINK1 (PARK6)

Quoique son rôle reste encore à être élucidé, la protéine codée par le gène *PINK1* est retrouvée dans la mitochondrie et permet de protéger la cellule en cas de désordre homéostatique [55,59]. Donc, la protéine PINK1 modifiée rendrait la cellule vulnérable à des phénomènes tels que le stress oxydatif, dont le contrôle est important dans l'homéostasie de la SNpc. Une étude récente montre qu'une surexpression de la protéine parkine peut réduire les conséquences d'une mutation de *PINK1* indiquant ainsi une avenue thérapeutique potentielle et suggérant une interaction entre les deux protéines [56].

1.5.1.4 Le gène codant pour DJ1 (PARK7)

Particulièrement exprimée dans les neurones DAergiques, la protéine DJ1 n'a pas encore de rôle déterminé. Mais certaines études lui confèrent un effet antioxydant dans la cellule, plus précisément dans le processus d'auto-oxydation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), une espèce réactive de l'oxygène (ROS) [57,59]. Aussi, cette protéine parviendrait à empêcher l'agrégation d' α -synucléine [45]. En effet, dans le cas d'une mutation dans le gène, la cellule serait moins apte à combattre le stress oxydatif causé par le H_2O_2 et subirait une augmentation de la

formation de CL [58]. À l'inverse, une surexpression de DJ1 réduit les dommages cellulaires causés par le stress oxydatif dans un modèle *in-vivo* [57].

1.5.2 La MP idiopathique

1.5.2.1 Le stress oxydatif

L'oxygène est un élément important du métabolisme cellulaire. Bien que ce dernier amène l'énergie nécessaire pour que la cellule puisse exercer ses fonctions, il entraîne aussi la production de molécules extrêmement réactives, les ROS. Ces dernières, possédant un électron libre, tentent de se stabiliser en réagissant avec n'importe quelle macromolécule qui se trouve sur leur passage, menant à la dégénérescence de ces dernières par oxydation [60]. Les trois ROS principaux sont, le peroxyde d'hydrogène, l'ion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyl (OH^{\bullet}). Cependant, la cellule dispose de molécules dont le rôle consiste à neutraliser ces espèces réactives [61]. Cet équilibre entre la création de ROS et leur neutralisation par des défenses antioxydantes fait en sorte que la cellule reste en vie. Lorsque le niveau de ROS excède celui des mécanismes antioxydants, il y a une situation de stress oxydatif pouvant mener à la mort cellulaire (Figure 1.10).

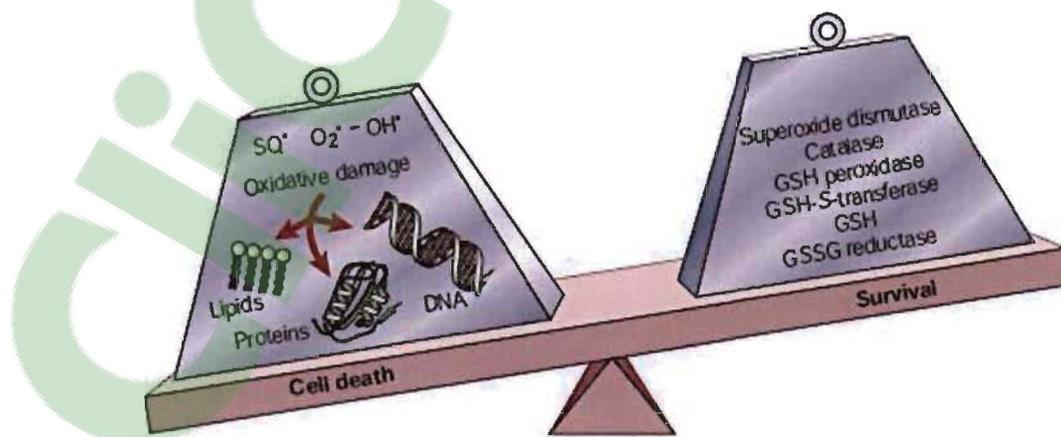


Figure 1.10 Illustration du déséquilibre causant le stress oxydatif [62].

1.5.2.1.1 Dommages cellulaires causés par les ROS

Les ROS sont capables d'oxyder et ainsi d'affecter le fonctionnement de nombreuses macromolécules importantes dans la cellule. Premièrement, les ROS peuvent réagir avec la guanine, constituant de l'ADN et l'ARN, ce qui peut affecter l'expression et la fonction de nombreuses protéines, dont entre autres, celles codées par l'ADN mitochondrial. Ces protéines peuvent inclure celles utilisées dans la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie qui utilise notamment l'oxygène. Une baisse d'expression ou une mutation de ces protéines augmentant la production de ROS [62,63]. Deuxièmement, les acides gras polyinsaturés peuvent être oxydés facilement, ce qui cause une perte de l'intégrité membranaire et des déséquilibres ioniques pouvant même aller jusqu'à de l'excitotoxicité [64]. Troisièmement, les espèces réactives de l'azote (NOS) comme le peroxy-nitrite (ONOO⁻) peuvent interagir avec la tyrosine hydroxylase (TH), une enzyme nécessaire pour la production de DA [41].

1.5.2.1.2 L'apoptose causée par le stress oxydatif

Non seulement les ROS oxydent les macromolécules de la cellule, mais elles peuvent aussi changer le potentiel membranaire de la mitochondrie en affectant sa chaîne de transport d'électrons et en provoquant une entrée d'ion calcium. Bien que la mitochondrie serve surtout d'usine énergétique, c'est aussi un joueur important dans la régulation de l'apoptose puisqu'un déséquilibre membranaire libère dans le cytosol des facteurs induisant l'apoptose, comme le cytochrome c [65]. Ce dernier enclenche des mécanismes intrinsèques de l'apoptose, notamment l'activation de caspases effectrices pouvant cliver des protéines importantes à la survie cellulaire, comme la protéine de réparation de l'ADN PARP-1. Cette dernière recrute des protéines réparatrices de l'ADN par le biais de modifications post-traductionnelles. Si PARP-1 est clivée par Caspase-3 clivée, elle ne peut plus reconnaître les bris sur l'ADN et elle ne peut plus demander de l'aide pour réparer l'ADN, ce qui facilite la fragmentation de ce dernier qui est caractéristique de l'apoptose. Le changement de potentiel membranaire

mitochondrial augmente encore plus la production de ROS créant un cercle vicieux qui, en retour, débalance encore plus la membrane. Au fil du temps, il y aura une entrée massive de l'ion calcium dans la mitochondrie, facilitant la sortie du cytochrome c ou du facteur induisant l'apoptose (AIF) [65]. Toutes les interactions énumérées dans cette sous-section sont illustrées à la figure 1.11.

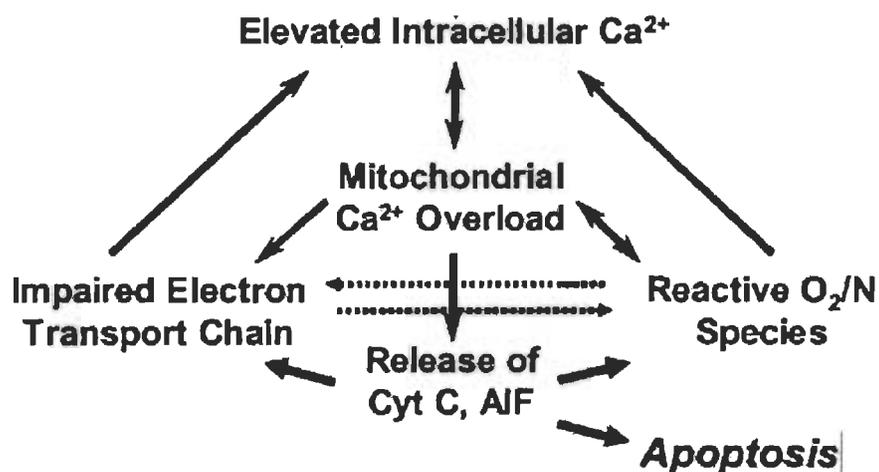


Figure 1.11 Relation entre le stress oxydatif et l'apoptose. Adapté de Fiskum *et al*, 2003 [65].

1.5.2.1.3 Le stress oxydatif, le cerveau et la MP

Le cerveau est un organe très vulnérable au stress oxydatif, et ce, pour plusieurs raisons. D'abord, 20 % de l'oxygène que consomme le corps l'est par le cerveau, ce qui signifie la production d'une grande quantité de ROS à cet endroit [66]. Ensuite, les membranes cellulaires des neurones sont particulièrement riches en acides gras polyinsaturés, ce qui facilite leur oxydation par des ROS [66]. De plus, les neurones ont une activité antioxydante endogène plus faible que la majorité des cellules du corps, les rendant moins aptes à neutraliser la production excessive de ROS [67]. Concernant plus particulièrement la SNpc, le neurotransmetteur DA, qui y est présent à un niveau élevé, possède un métabolisme très favorable à la création de molécules endogènes toxiques pour les neurones, qui sera expliqué plus en détail dans la sous-sous-section 1.5.2.1.4 [68]. Finalement, la SNpc est la région du cerveau possédant le plus haut taux d'ion fer,

qui est utilisé pour former, par la réaction de Fenton, des ROS très réactives [69]. Cette réaction sera décrite à la sous-sous-section 1.5.2.1.4. Ces quatre aspects expliquent pourquoi le cerveau, et plus particulièrement la SNpc, sont sensibles au stress oxydatif, un phénomène cellulaire qui, selon certaines études, serait relié à la MP [63,65,70,71].

1.5.2.1.4 Mécanismes de production de ROS dans les neurones DAergiques

Comme il a été indiqué au début de la section précédente, la formation de ROS est un processus tout à fait normal. Dans les neurones DAergiques, les ROS peuvent être produites de trois façons : par la chaîne de transport d'électron mitochondriale, via le métabolisme de la DA et par la réaction de Fenton.

La chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie est la principale voie de formation de ROS. Ce processus cellulaire permet le passage des électrons qui seront utilisés pour produire l'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule. Mais, il arrive à certains moments que ce processus soit débalancé. Dans ce cas, des intermédiaires réactionnels sont relâchés dans le cytosol : les ROS.

Les neurones DAergiques contiennent, comme le nom indique, d'importantes quantités de DA. Lorsqu'elle n'est pas utilisée, elle est emmagasinée dans des vésicules synaptiques au contenu alcalin, empêchant son oxydation [72]. Cependant, si ce neurotransmetteur parvient à se retrouver dans le cytosol, un environnement plus acide que les vésicules, la DA s'auto-oxyde en produisant de l' $O_2^{\bullet-}$ [73]. Ce dernier peut aussi réagir avec des NOS et former une ROS encore plus réactive, du OH^{\bullet} . De plus, la DA réagit avec l'enzyme monoamine oxydase B (MAO-B) pour produire du H_2O_2 [74].

Finalement, par la réaction de Fenton, le H_2O_2 , une ROS moyennement réactive vu l'absence d'électron libre, peut agir avec un ion fer pour former du

OH^\bullet , une ROS très toxique pour le neurone [75]. L'ensemble des réactions expliquées dans cette sous-section est présenté à la figure 1.12.

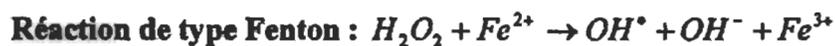
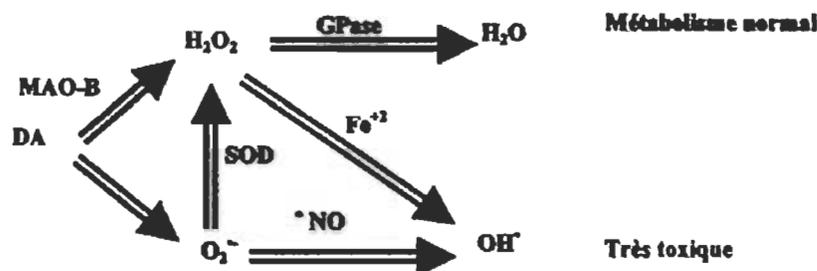


Figure 1.12 Création de ROS via l'oxydation de la DA et la réaction de Fenton [60].

1.5.2.1.5 Défenses antioxydantes

La cellule dispose de trois enzymes principales ayant une activité antioxydante : la catalase (Cat), la glutathion peroxydase (GPX) et la superoxide dismutase (SOD). La Cat permet de convertir deux molécules de H_2O_2 en deux molécules d'eau et une molécule d'oxygène. Cela empêche qu'un surplus de H_2O_2 soit dévié vers la réaction de Fenton. La GPX quant à elle fait partie d'un système élaboré d'oxydoréduction utilisant le glutathion réduit (GSH) comme substrat. En utilisant deux molécules de GSH, la GPX convertit une molécule d' H_2O_2 en une molécule d'eau. Suite à cette réaction, les molécules de glutathion deviennent oxydées (GSSG), mais peuvent revenir à un état réduit grâce à la glutathion réductase (GR) et au nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH). La Cat et la GPX sont impliqués dans la MP, car il a été prouvé que l'activité enzymatique de ces deux enzymes se voit réduite chez des parkinsoniens [76]. Finalement, la SOD est spécialisée dans la conversion de deux molécules d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ en une molécule de dioxygène et une molécule d' H_2O_2 . Cette dernière peut à son tour être neutralisée par la Cat ou la GPX, démontrant

une certaine relation entre ces enzymes antioxydantes. Les réactions décrites dans cette sous-section sont illustrées dans la figure 1.13.

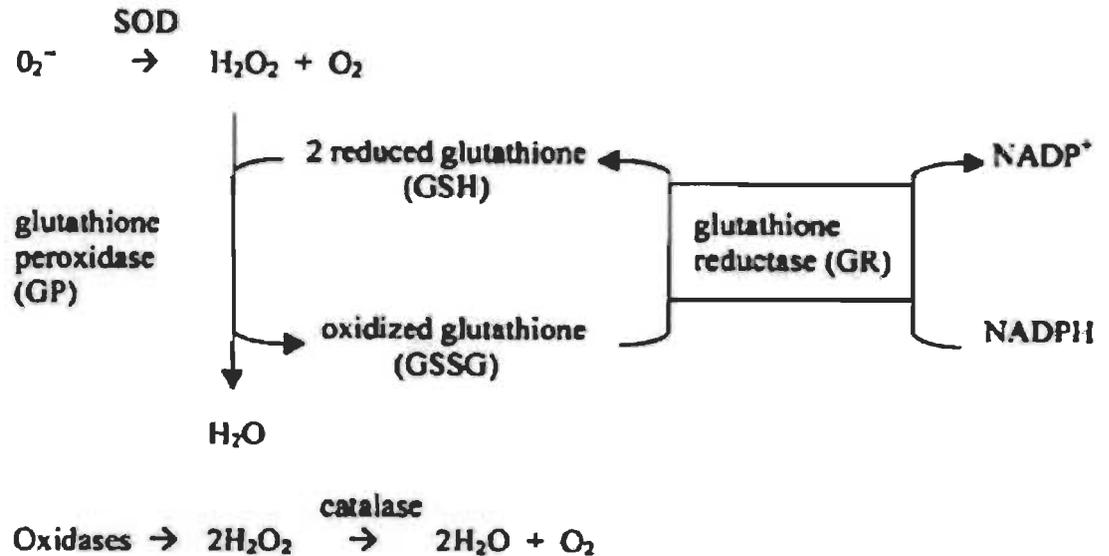


Figure 1.13 Mécanismes d'action des enzymes antioxydantes de la cellule [77].

1.5.2.2 La neuro-inflammation

L'immunité du système nerveux central a fait l'objet de nombreuses recherches sur le cancer, ainsi que des expériences utilisant des bactéries et des virus. Ces expérimentations ont donné l'impression que notre système nerveux central était dépourvu d'immunité [78-80]. Ce n'est qu'au début du 21^e siècle que la communauté scientifique a réussi à déterminer que notre cerveau et notre moelle épinière possèdent un système immunitaire qui leur est propre [81]. Celui-ci est composé de deux éléments principaux : la barrière hémato-encéphalique (BHE) et les cellules gliales. Composée de la membrane basale des capillaires sanguins, des péricytes, des pieds astrocytaires et des cellules endothéliales cérébrales, la BHE maintient l'homéostasie cérébrale et empêche l'entrée d'éléments indésirables de l'immunité systémique (Figure 1.14) [82]. Cependant, des maladies comme la MP ou la MA affectent la perméabilité de cette barrière [82,83]. C'est pour cette raison

que l'immunité cérébrale a à sa disposition d'autres moyens de défense en cas d'intrusion, les cellules gliales.

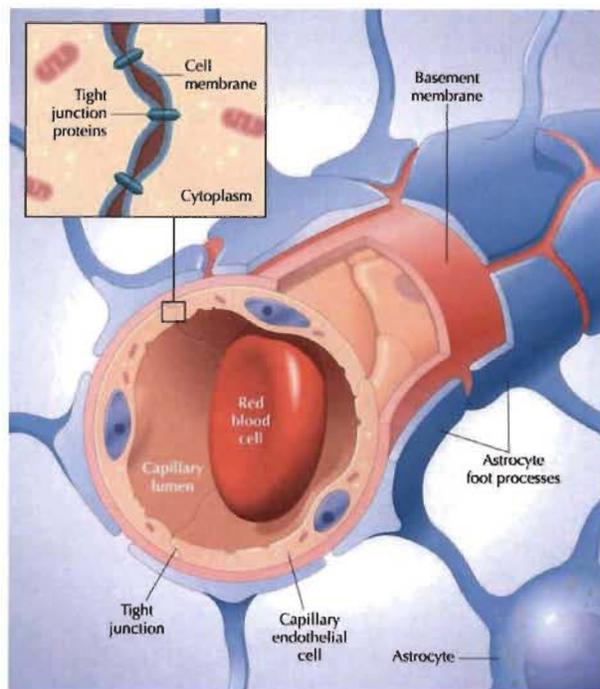


Figure 1.14 Représentation schématisée de la BHE [84].

1.5.2.2.1 Les cellules de la neuroinflammation : les cellules gliales

Les cellules gliales qui ont un rôle au niveau de l'immunité sont les astrocytes, les microglies et les oligodendrocytes. Ces derniers n'ayant qu'un rôle beaucoup moins connu, ce mémoire traitera uniquement des deux premiers plus en détail.

Les astrocytes étaient historiquement considérés comme des cellules de soutien, parce qu'elles accomplissent des rôles comme le maintien de l'équilibre homéostatique du cerveau [85]. Il a été rapporté que des neurones en culture produisent une activité synaptique moindre en l'absence d'astrocytes [85]. Lorsqu'une réponse inflammatoire est enclenchée dans le système nerveux, les astrocytes se déplacent au site affecté où ils s'activent et adoptent une morphologie hypertrophique. Suite à ce changement, les astrocytes créent une barrière autour de la zone affectée permettant de contenir l'inflammation et d'empêcher sa

propagation, un mécanisme appelé la cicatrisation gliale. Lors de ce processus, les astrocytes sécrètent des facteurs neurotrophiques, tel le «brain derived neurotrophic factor» (BDNF) et le «glial cell line-derived neurotrophic factor» (GDNF) pour promouvoir la réparation et la survie neuronale lors de la réponse inflammatoire [86-88]. De plus, les astrocytes peuvent sécréter des cytokines et des chemokines contribuant à la réponse inflammatoire [86].

Étant la cellule principale de l'immunité du cerveau et du SNC, la microglie est aussi surnommée le «macrophage du cerveau». Ce n'est qu'au sein du cerveau mature que la microglie commence à exercer son rôle immunitaire [89]. Lorsqu'elle est au repos, la microglie adopte une morphologie ramifiée et possède une faible activité transcriptionnelle [90,91]. Dans cette situation, elle utilise ses multiples ramifications mobiles pour surveiller ses alentours et favoriser le contact cellulaire direct avec des neurones ou d'autres cellules gliales [92]. Cet état de repos est maintenu par de nombreux signaux, illustrés à la figure 1.15 [93]. Ce sont d'abord des cytokines sécrétées par les astrocytes, notamment l'interleukine 10 (IL-10) et le facteur de croissance transformant beta (TGF- β). Il y a ensuite la sécrétion de facteurs solubles et l'activité électrique des neurones sains. Puis il y a l'interaction entre la glycoprotéine neuronale CD200 et le récepteur microglial CD200R.

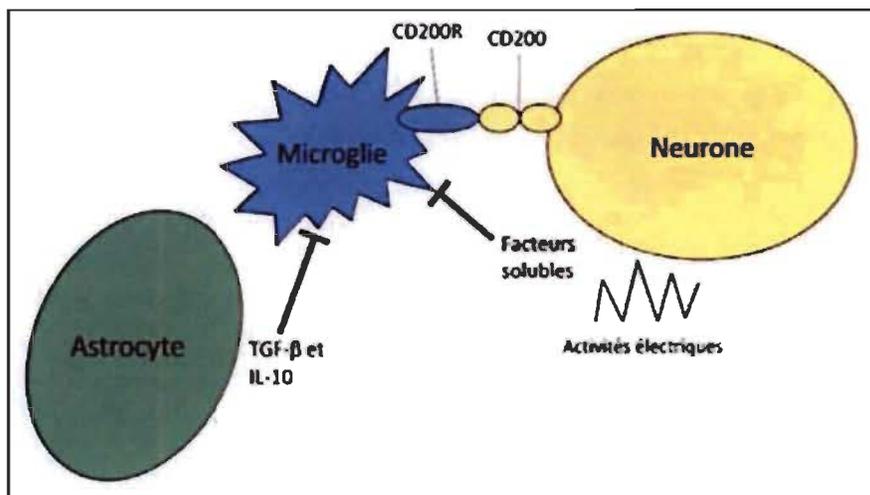


Figure 1.15 Facteurs favorisant l'état de repos de la microglie [93].

L'activation microgliale se fait soit lorsqu'il n'y a plus d'influence inhibitrice sur la microglie ou lorsqu'un signal neurotoxique est capté par la cellule gliale (Figure 1.16). Ce signal peut prendre plusieurs formes et est capté par des «pattern recognition receptors» (PRR). Premièrement, il y a différents facteurs libérés par les neurones endommagés comme la substance P ou l'ATP [94,95]. Il peut aussi y avoir des toxines environnementales comme le méthyl-4-phényl-1-2-3-6-tétrahydropyridine (MPTP) ou le paraquat (PQ), des substances retrouvées dans les pesticides qu'on utilise en milieu agricole [96]. Finalement, le lipopolysaccharide (LPS) bactérien, qui est un puissant activateur du système immunitaire, active également les microglies [97]. Suite à son activation, la microglie adopte une morphologie ronde et commence à exercer son rôle de cellule immunitaire (Figure 1.17).

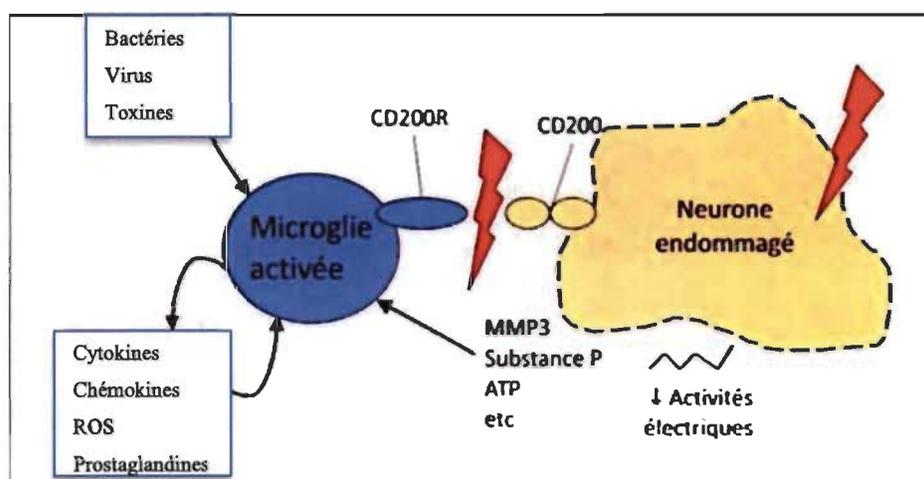


Figure 1.16 Facteurs favorisant l'activation microgliale [93].

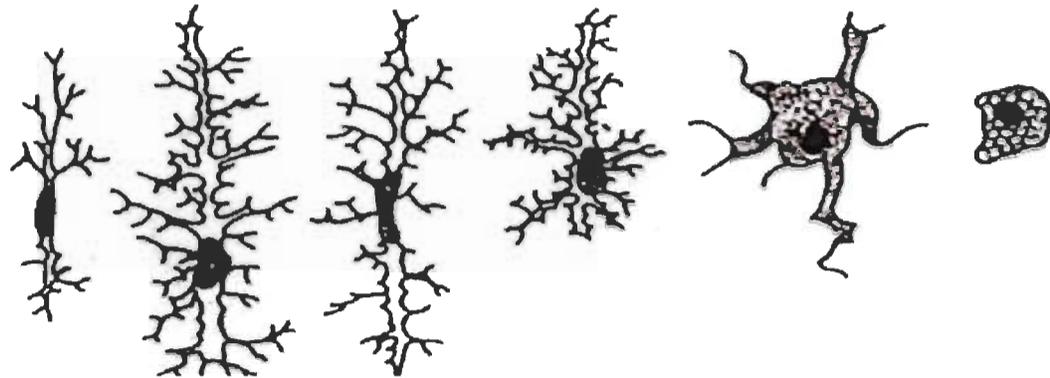


Figure 1.17 Illustration de l'évolution de la morphologie microgliale pendant son activation (de gauche à droite) [98].

1.5.2.2.2 Les dommages cellulaires dus à la neuroinflammation causée par les microglies

Lorsque les microglies sont activées, elles sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, principalement du facteur de nécrose tumoral alpha (TNF- α) et de l'interleukine 1 (IL-1). Ces cytokines agissent directement et indirectement sur le neurone dopaminergique, tel qu'illustré à la figure 1.18.

Dans la voie indirecte, les cytokines vont se lier à un récepteur intracellulaire de l'immunoglobuline E de faible affinité, le récepteur CD₂₃. Ce dernier permet d'activer l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), engendrant la production d'oxyde nitrique (NO) qui diffuse hors de la cellule microgliale [99]. Le NO peut donc entrer dans le neurone dopaminergique et y réagir avec du O₂^{-•} pour former du ONOO⁻, un NOS causant plusieurs dommages à l'intérieur de la cellule. Cette réaction démontre l'interaction entre les processus de stress oxydatif et de neuro-inflammation.

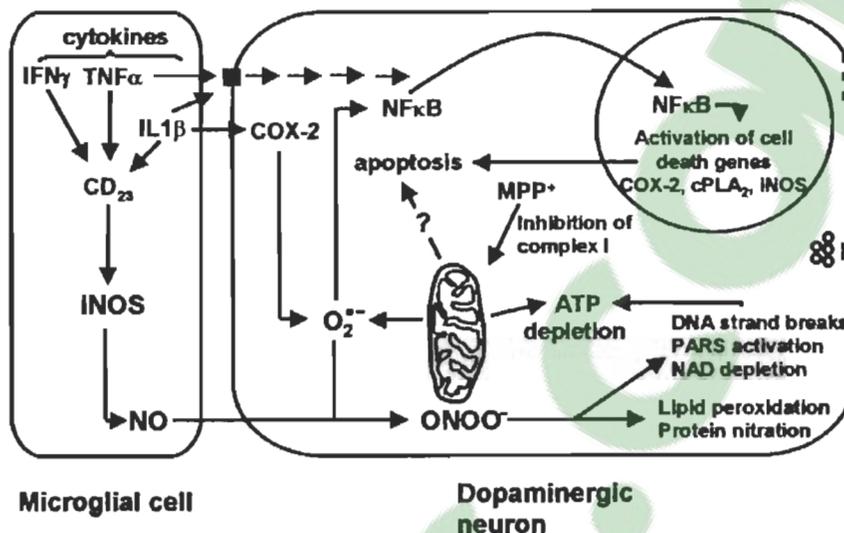


Figure 1.18 Implication des microglies activées dans la mort des neurones DAergiques [100].

Dans la voie directe, les cytokines pro-inflammatoires sortent de la cellule microgliale et se lient ensuite à leurs récepteurs respectifs à la surface des neurones DAergiques. Il y a deux récepteurs possibles pour le TNF- α , TNFR1 et TNFR2, mais seulement le premier est impliqué dans la neuroinflammation, alors que le récepteur de l'IL-1 est IL-1R. L'activation de ces récepteurs entraîne la phosphorylation et la dégradation d'un inhibiteur du facteur nucléaire κ B (I κ B) [100,101]. Sans son inhibiteur, les sous-unités p65 et p50 du facteur nucléaire κ B (NF- κ B) peuvent se déplacer au noyau pour accomplir leur activité transcriptionnelle, qui est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires. Dans le contexte plus spécifique de la neuro-inflammation, il y a transcription des gènes pro-inflammatoires de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2), d'iNOS et de la phospholipase A2 cytosolique (cPLA2). COX-2 et iNOS augmentent la production de molécules pro-inflammatoires, respectivement la prostaglandine E (PGE) et le NO, alors que dans le cas de cPLA2, il y a augmentation de la production d'acide arachidonique (AA), un précurseur de la synthèse de molécules inflammatoires, telles les prostaglandines et les leucotriènes, à partir des phospholipides membranaires.

1.5.2.2.3 La neuroinflammation comme agent étiologique de la MP

Plusieurs découvertes ont permis de tisser un lien entre la MP et la neuroinflammation. Tout a commencé en 1988 quand McGeer et son équipe ont rapporté que la SN de cerveaux *post-mortem* de parkinsoniens avait un niveau d'activation des microglies plus élevé que celle de cerveaux sains [102]. Deux ans plus tard, il a été montré que la plus forte concentration de microglies dans tout le SNC se retrouve dans la SNpc [103]. Ensuite, il a été prouvé qu'il y avait une production accrue de cytokines pro-inflammatoires chez les patients parkinsoniens [104]. Cette production augmente par ailleurs normalement avec l'âge, permettant peut-être de tracer un lien entre la neuroinflammation et l'âge moyen de l'occurrence de la MP [105]. De plus, la prise régulière d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens baisse la prévalence de la MP [106]. Finalement, au cours des dernières années, plusieurs études de patients parkinsoniens et de modèles animaux ont montré une activation localisée de la microglie au niveau de la SNpc [107,108].

Ces éléments sont compatibles avec l'hypothèse que la neuro-inflammation aurait un rôle à jouer dans l'étiologie de la MP. Cependant, on ne sait toujours pas si l'inflammation est la cause de la destruction neuronale ou si c'est la destruction neuronale qui active la microglie, provoquant une boucle d'amplification inflammatoire. Ce principe est présenté à la figure 1.19.

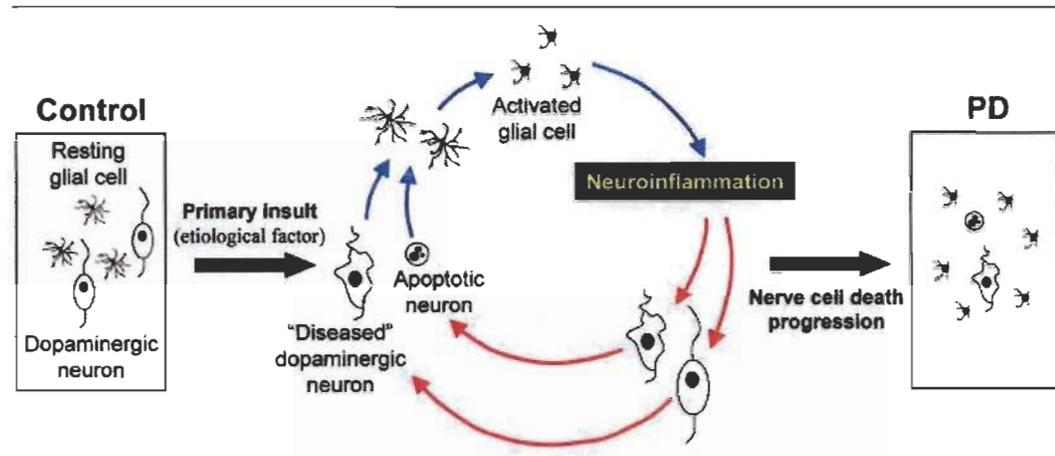


Figure 1.19 Schématisation de l'influence de la neuroinflammation dans la destruction neuronale dopaminergique [89].

1.6 Modèles d'étude de la MP

Il existe plusieurs modèles pour étudier la MP autant pour le stress oxydatif que la neuroinflammation. Ce mémoire traitera des principales toxines qui sont utilisées pour induire un syndrome parkinsonien expérimentalement ainsi que d'une méthode de co-culture microglie-neurone qui permet d'étudier les principales relations cellulaires qui se déroulent durant la neuroinflammation.

1.6.1 Le MPTP (et le MPP^+)

Le MPTP (Figure 1.20), un composé surtout utilisé dans la production de pesticides, a été découvert dans les années 80 lorsque des toxicomanes ont commencé à montrer des symptômes de la MP suite à des injections d'héroïne synthétique contaminé avec cette toxine [109]. De nature lipophile, elle peut traverser facilement la BHE pour atteindre les neurones. Cependant ce n'est pas le MPTP en tant que tel qui affecte le neurone. Avant que la toxine entre dans le neurone, l'enzyme MAO-B contenue dans les cellules gliales convertissent le MPTP en ion MPP^+ (Figure 1.20). En entrant dans le neurone par le transporteur de la DA (DAT), cet ion peut affecter le neurone de deux manières : soit en

réagissant avec des protéines chargées négativement dans la cellule soit en inhibant le premier élément de la chaîne de transport d'électron mitochondriale, provoquant la sortie de ROS. Le syndrome parkinsonien qu'il cause est grave et irréversible dans des modèles animaux et humains [110,111]. À l'inverse, le MPP^+ peut être neutralisé lorsqu'il est emmagasiné dans des vésicules. Les mécanismes d'action du MPTP et du MPP^+ sont illustrés à la figure 1.21.

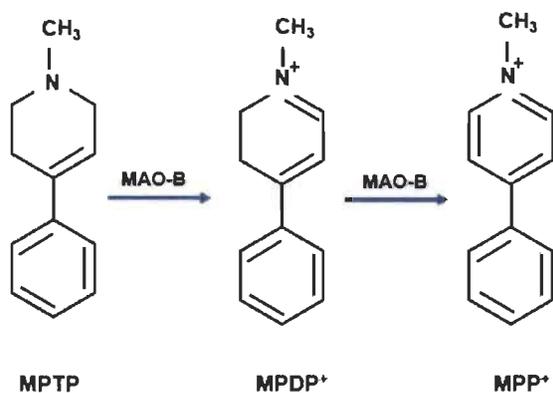


Figure 1.20 Transformation du MPTP en MPP^+ [112].

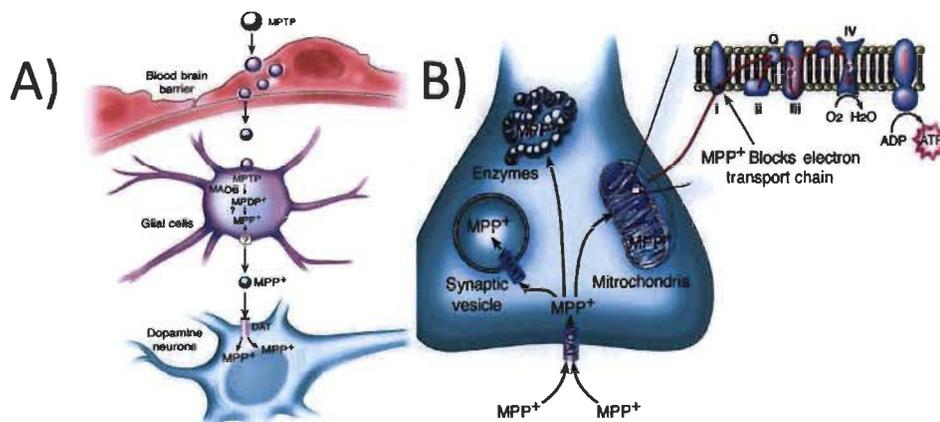


Figure 1.21 Entrée du MPTP (A) et mécanismes d'action du MPP^+ (B) à l'intérieur de neurones DAergiques [15].

1.6.2 La 6-hydroxydopamine (6-OHDA)

La 6-OHDA est tout simplement une forme hydroxylée de la DA (Figure 1.22). Notamment retrouvée physiologiquement chez les patients de la MP, grâce au métabolisme de la DA, sa présence semble être un précurseur dans la progression de la maladie [113]. Elle est reconnue comme la première neurotoxine qui a été utilisée pour induire un syndrome parkinsonien *in-vivo* ou *in-vitro* [114]. Contrairement au MPTP, cette toxine ne peut pas traverser la BHE [110,111]. Elle nécessite donc d'être injectée directement dans le cerveau dans les modèles animaux. Pour pénétrer dans le neurone, la 6-OHDA passe par le DAT et peut ensuite, tout comme le MPP⁺, aller inhiber le premier élément de la chaîne de transport d'électron mitochondriale pour augmenter la production de ROS (Figure 1.23) [115]. De plus, cette toxine peut inhiber des enzymes antioxydantes comme la SOD et la GPX [116,117]. Finalement, vu sa ressemblance structurale avec la DA, la 6-OHDA peut également s'oxyder pour produire du H₂O₂ (Figure 1.12) [68]. Dans le cadre de mon projet de recherche de maîtrise, c'est cette toxine qui a été utilisée pour induire la mort cellulaire via un stress oxydatif.

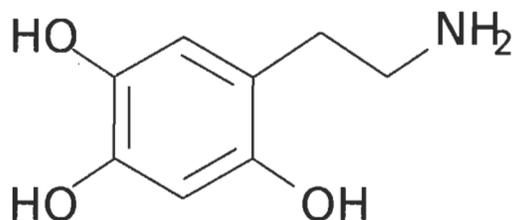


Figure 1.22 Structure de la 6-OHDA [118].

1.6.3 Autres toxines

Quoique moins utilisées dans des modèles expérimentaux, des toxines d'origine environnementale comme le paraquat, la roténone ou le maneb peuvent être utilisées pour induire un syndrome parkinsonien. Comme le MPP⁺ ou la 6-OHDA, ces toxines inhibent le premier élément de la chaîne de transport d'électron mitochondriale, comme l'illustre la figure 1.23 [110].

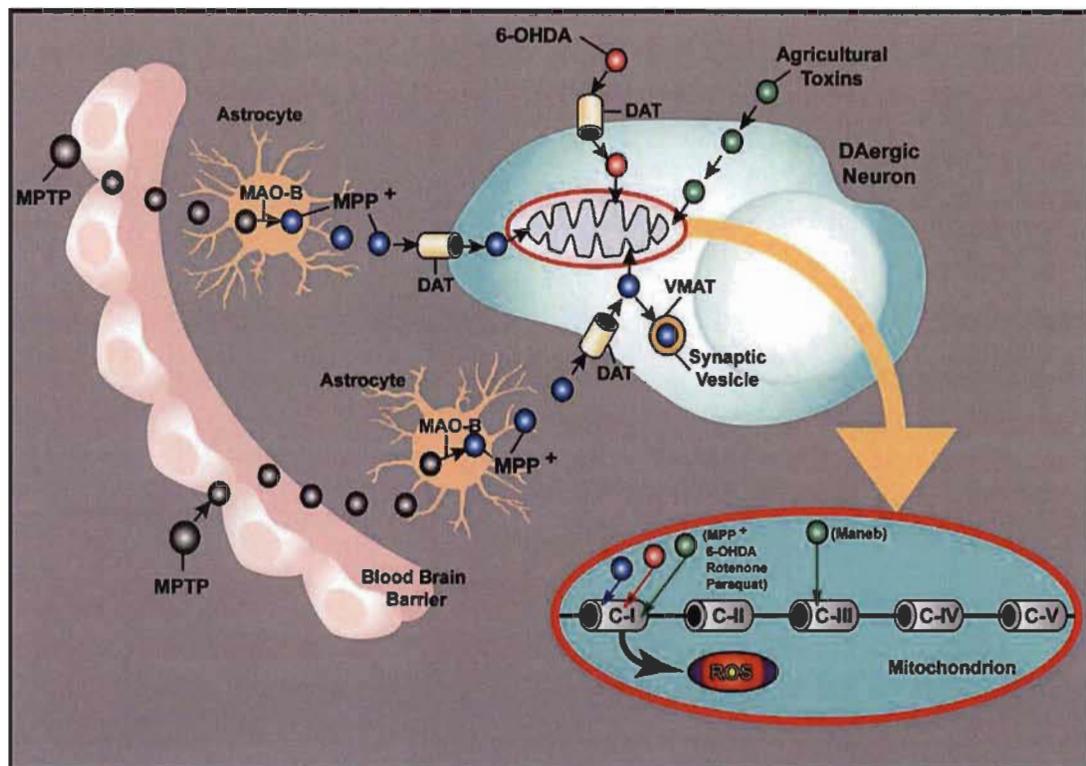


Figure 1.23 Mode d'action des principales toxines utilisées dans l'étude de la MP [111].

1.6.4 La co-culture cellulaire : un modèle d'étude de la neuroinflammation

Pour étudier l'hypothèse de la neuroinflammation dans la MP, il devient primordial d'étudier l'influence paracrine que les cellules inflammatoires gliales ont sur les neurones. Donc, la culture cellulaire mixte, neurones-cellules gliales, devient obligatoire mais comporte des inconvénients. Principalement, le contact cellulaire peut rendre difficile l'interprétation des résultats surtout dans un contexte de communication paracrine. Aussi, il devient difficile de trouver un bon milieu de culture qui convient également aux deux populations cellulaires utilisées.

C'est pour cette raison que récemment, une nouvelle méthode de culture cellulaire mixte a vu le jour : la co-culture cellulaire (voir chapitre 2.1 pour plus

de détails sur les cultures cellulaires utilisées dans ce projet de recherche). Cette méthode est basée l'utilisation d'inserts où croît un premier type cellulaire. Cet insert possède une membrane semi-perméable avec des pores qui permet seulement le passage de molécules très petites, comme les cytokines pro-inflammatoires. L'insert peut être introduit dans un puits d'une plaque multipuits contenant un autre type cellulaire. Dans cette situation chacun des compartiments possède son propre milieu de culture et il n'y a aucun contact cellulaire direct entre les deux populations de cellules. En d'autres termes, seulement l'échange de facteurs solubles induit les changements au niveau des populations cellulaires du modèle. Le principe de la co-culture cellulaire est illustré à la figure 1.24.

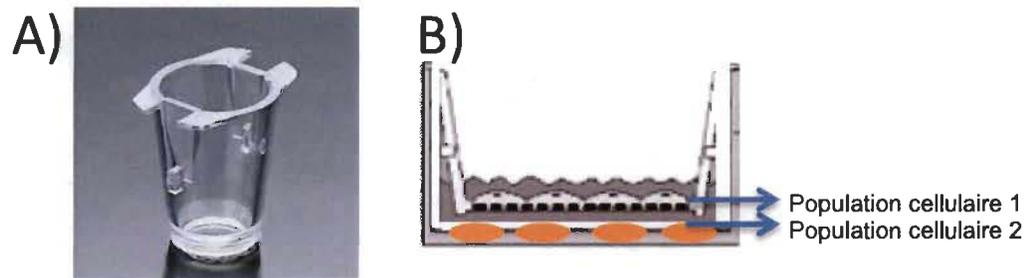


Figure 1.24 Insert utilisé pour la co-culture (A) et schématisation de la co-culture cellulaire (B).

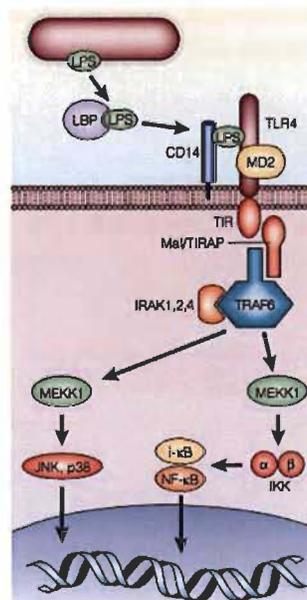


Figure 1.25 Mécanisme d'activation de la microglie par le LPS [119].

Dans le cas de la MP, un exemple de co-culture consiste à cultiver des microglies dans des inserts ainsi que des neurones au fond de plaques multipuits. Dans le cadre de mon projet de recherche, la lignée microgliale N9 a été utilisée, mais il existe d'autres lignées comme la lignée BV-2 qui peuvent être utilisées comme modèle cellulaire des microglies [120,121]. Ensuite, il y a activation microgliale par des toxines comme le lipopolysaccharide bactérien (LPS). Le LPS est le plus utilisé, mais l'activation microgliale est possible par d'autres toxines parkinsoniennes comme le MPTP [122].

Le LPS est une composante membranaire des bactéries gram négatives et il est un puissant activateur de la microglie [123]. Cette endotoxine se lie sur la protéine de liaison du LPS près de la microglie pour former un complexe. Ce dernier se lie ensuite au récepteur CD14-TLR4 et à la protéine de différenciation myéloïde 2 (MD-2) sur la membrane de la microglie [124,125]. La cascade de signalisation cellulaire qui est activée aboutit en la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 et l'interleukine 6 (IL-6) via le facteur de transcription NF- κ B [126]. Cette signalisation est illustrée à la figure 1.25.

Afin d'étudier la MP, le LPS est grandement utilisé pour causer une activation microgliale qui engendra une réaction inflammatoire ainsi qu'un stress oxydatif affectant les neurones dopaminergiques à proximité. En effet, plusieurs études effectuées *in-vitro* [127] ainsi que dans la SNpc de rats ont démontré une destruction des neurones DAergiques [97,128,129]. Cette destruction a été causée par une sécrétion microgliale de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α [130], le NO [131] et l'IL-6 [132]. De plus, dans notre laboratoire, ce modèle est utilisé et il a démontré que l'activation microgliale au LPS augmente leur production de cytokines pro-inflammatoire qui cause la mort des neurones dopaminergiques dans une co-culture [133]. C'est pour cette raison que dans le

cadre de mon projet de recherche, cette toxine sera utilisée pour activer la microglie dans un modèle de co-culture.

1.7 Traitements de la MP

1.7.1 Les traitements pharmacologiques

L'objectif principal des traitements pharmacologiques est de réguler la quantité de DA dans le cerveau afin de réduire les symptômes. Le traitement le plus utilisé est sans contredit la dopathérapie utilisant la lévodopa ou L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-dopa), qui est un intermédiaire dans la production de la DA. En effet, ce précurseur est transformé par l'enzyme dopa décarboxylase (DDC) en DA par divers types cellulaires (Figure 1.26). Alors, pourquoi utiliser la L-dopa plutôt que la DA directement? Parce que la DA, contrairement à la L-dopa, ne peut pas passer la BHE. Malheureusement, la dopathérapie n'est pas sans effets secondaires et n'est efficace qu'à court ou moyen terme, puisque la L-dopa peut causer des dyskinésies dont la fréquence augmente après 5 à 10 ans de traitement avec la L-Dopa [134]. Un autre problème rencontré avec ce traitement est que la DDC est ubiquitaire dans tout le corps. Donc, la quasi-totalité de la L-dopa est transformée en DA avant qu'elle puisse atteindre la BHE, ce qui nécessite l'utilisation d'inhibiteurs de DDC comme le carbidopa ou le benserazide pour augmenter les taux sanguins de L-Dopa [135].

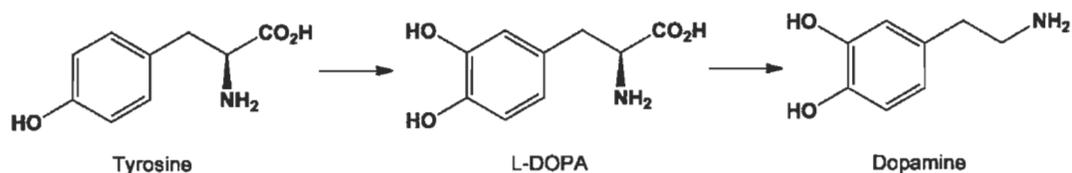


Figure 1.26 Métabolisme de la dopamine.

Un autre traitement pharmacologique possible est l'administration d'agonistes DAergiques qui, contrairement à la DA, passent la BHE et recréent l'effet de la DA en se liant à son récepteur. Cependant, les agonistes possèdent

beaucoup d'effets secondaires dont les principaux sont des hallucinations, de la confusion, de la fatigue et des nausées [16,18,136]. Ils sont souvent combinés à la dopathérapie, ce qui permet de diminuer la dose de L-dopa nécessaire à la suppression des symptômes et ainsi augmenter la durée effective du traitement avant l'apparition de dyskinésies.

1.7.2 Les traitements chirurgicaux

L'objectif principal de ces traitements est de cibler directement ou d'enlever la zone affectée dans la voie nigro-striée. En effectuant une thalamotomie, soit une ablation du noyau ventral intermédiaire du thalamus, on peut diminuer l'intensité de symptômes tels que la rigidité ou la douleur et même faire disparaître les tremblements dans environ 80 % des cas. Néanmoins, cette procédure n'est pas sans risques, car elle peut causer des séquelles graves comme des problèmes d'équilibre, une baisse des capacités intellectuelles ou même d'autres déficits moteurs qui s'apparentent à la MP.

Une autre option chirurgicale est la pallidectomie, qui consiste en une ablation unilatérale d'une partie du GP. Elle résulte en une diminution des tremblements, les dyskinésies et la rigidité observés chez les parkinsoniens, mais il arrive souvent que les symptômes reviennent ou même qu'ils ne disparaissent pas du tout. Il faut donc considérer l'option d'une ablation bilatérale qui peut engendrer des effets secondaires sévères et irréversibles tels que des troubles du langage, des difficultés dans les processus de la mémoire, ainsi que des problèmes comportementaux comme l'apathie et la dépression.

Pour les patients dont la maladie est avancée, mais qui répondent encore bien à la dopathérapie, la stimulation cérébrale profonde, ou «Deep Brain Stimulation» (DBS), qui consiste en la pose d'électrodes dans une zone affectée par la MP, permet de stimuler l'effet d'une lésion chirurgicale sur le cerveau par le biais d'un influx électrique. La zone choisie dépend principalement des

symptômes qui sont observés [20]. L'influx est transmis constamment par un boîtier placé sous la clavicule. Étant donné qu'il s'agit d'une opération chirurgicale, la DBS est couteuse et risquée, cependant, dès que l'implant a été inséré, on observe peu d'effets secondaires et il est possible de contrôler le signal électrique afin d'obtenir le meilleur effet possible [20].

1.8 Stratégies de prévention de la MP par l'utilisation de molécules antioxydantes

Bien que les traitements qui viennent d'être présentés permettent d'améliorer la qualité de vie des patients parkinsoniens, ils ne permettent pas d'éradiquer complètement la maladie. C'est pour cette raison qu'une partie de la communauté scientifique se tourne vers des approches de nature préventive et complémentaire aux traitements pharmacologiques décrits dans les sections précédentes. Ces dernières années, plusieurs ouvrages ont mis au jour le potentiel antioxydant et anti-inflammatoire de molécules végétales présentes dans notre alimentation, démontrant que une certaine protection contre des maladies à composante inflammatoire comme la MP serait peut-être plus accessible qu'on ne le pense. C'est dans cette optique que notre laboratoire se spécialise dans l'effet neuroprotecteur des polyphénols, des substances naturelles qui se retrouvent dans notre alimentation. Ce mémoire traitera de deux polyphénols : le trans-resvératrol et la trans- ϵ -viniférine.

1.8.1 Le trans-resvératrol (resvératrol)

Le resvératrol est un stilbène formé de deux noyaux phénols reliés par un groupement éthène (Figure 1.27). Ce polyphénol se retrouve principalement dans les raisins et le vin rouge, mais il est aussi présent dans des petits fruits, des noix mais aussi dans le thé [137]. Il est normalement produit par les plantes pour offrir une protection contre des organismes indésirables comme les champignons et les moisissures [138]. À cause de sa liaison double sur son groupement éthène, le

resvératrol peut adopter deux formes : cis et trans. Bien que la forme cis soit la forme majoritairement présente dans les plantes, elle est très instable et l'irradiation par les rayons UV présents dans la lumière induit sa transformation rapide en forme trans, celle qui est active biologiquement.

L'engouement pour cette molécule est venu en partie grâce au «paradoxe français». Ce paradoxe résulte du fait que même si l'alimentation française et méditerranéenne est très riche en gras polyinsaturé, la consommation modérée de vin expliquerait pourquoi leur incidence pour les maladies cardiovasculaires est une des plus basses au monde [139,140]. C'est pour cette raison que le resvératrol a été d'abord reconnu pour son effet cardioprotecteur [141,142]. Par la suite, d'autres bienfaits de cette molécule ont été observés comme des effets estrogéniques, anticancéreux et finalement neuroprotecteurs.

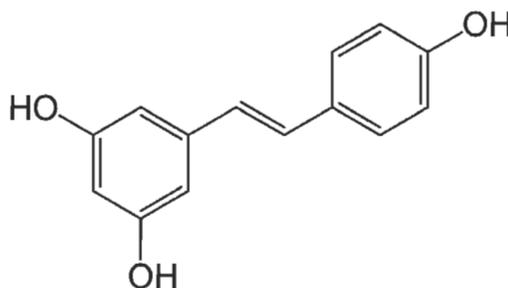


Figure 1.27 Structure du trans-resvératrol.

La biodisponibilité est un autre élément important en ce qui concerne le resvératrol. Son absorption au niveau de l'intestin grêle atteint environ 75%, ce qui est très élevé en ce qui concerne les polyphénols provenant de l'alimentation [143]. Ce fait est prouvé grâce à des études qui comparent les niveaux plasmatiques lors d'une prise orale contrairement à une prise intraveineuse [144] ainsi que des recherches se basant sur des modèles cellulaires d'absorption intestinale chez l'humain [145]. Cependant, la quasi-totalité du polyphénol est métabolisé au niveau du foie, de l'intestin grêle et de la flore bactérienne du gros

intestin pour ne laisser que 1% de resvératrol dans le sang, le reste étant des métabolites beaucoup moins efficaces comme des sulfates (trans-resvératrol-3-sulfate) ainsi que de glucoronides (trans-resvératrol-3-O-glucoronide) [143]. C'est pour cette raison que des traitements préventifs qui pourrait combiner du resvératrol avec d'autres polyphénols, comme le curcumin, seraient une alternative qui pourrait donner de meilleurs résultats [146]. De plus, des traitements qui combindraient du resvératrol avec des enzymes comme la β -glucuronidase ou des sulfatases pourraient reconverter les métabolites en resvératrol [147-149]

1.8.1.1 Effet estrogénique

Le resvératrol est également considéré comme un phyto-estrogène étant donné sa similarité structurale avec l'hormone sexuelle féminine l'œstradiol (E2). Des études ont démontré le potentiel antioxydant, anti-apoptotique et anti-inflammatoire de l'E2 [150-152]. Cependant en 2003, une étude sur les effets de E2 a démontré que cette molécule pouvait causer l'apparition de cancer hormono-dépendants [153,154]. Le resvératrol se lie au récepteur de l'E2, avec une affinité 7000 fois moindre que l'E2, ce qui permettrait une activation de bas niveau des récepteurs sans activer les mécanismes mitotiques causant l'apparition de cancers [155,156].

1.8.1.2 Effet neuroprotecteur

Le resvératrol a aussi un potentiel antioxydant, anti-apoptotique et anti-inflammatoire dans les cellules neuronales. Tout d'abord, le resvératrol est capable de réduire la production de ROS de deux manières. Premièrement, les nombreux doublets d'électrons ainsi que les atomes d'hydrogène des groupements phénol peuvent neutraliser les ROS et ainsi prévenir les dommages cellulaires [157-159]. Deuxièmement, le resvératrol favorise les voies de signalisation de plusieurs enzymes antioxydantes, comme la SOD, la Cat, la GPX et l'hème oxygénase (HO-1) [160-162].

Le rôle anti-apoptotique du resvératrol a été grandement étudié dans notre laboratoire puisque nous avons démontré son effet dans des modèles de cellules PC12 cultivées en condition hyperglycémique et des cellules PC12 traitées avec la toxine MPP⁺ [163,120]. Cet effet serait majoritairement expliqué par le fait que le resvératrol est un activateur de la déacétylase sirtuine 1 (SIRT1) qui dans des situations comme le stress oxydatif ou la neuroinflammation, serait capable de garder sous forme inactive la protéine pro-apoptotique p53 par déacétylation [164].

En ce qui concerne son potentiel anti-inflammatoire, lorsque le resvératrol est ajouté à des microglies avant leur activation au LPS, il bloque la production de molécules pro-inflammatoires. En effet, il empêche la phosphorylation d'I κ B [165] et lorsque celui-ci n'est pas phosphorylé, NF- κ B ne peut se rendre au noyau pour y initier la production de TNF- α , d'IL-1 ou d'iNOS entre autres [166]. De plus, le resvératrol peut aussi diminuer la production de prostaglandines pro-inflammatoires comme PGE grâce à l'inhibition de la production de COX-2 [159]. Le resvératrol peut aussi inhiber indirectement NF- κ B de plusieurs manières. Il peut inhiber des phosphodiesterases ou activer SIRT1, ce qui induit l'activation de l'AMP-activated protein kinase (AMPK). Cette dernière inhibe NF- κ B et empêche la production de cytokines pro-inflammatoires. De plus, SIRT1 peut inhiber directement NF- κ B ou le facteur de transcription AP-1 qui induit normalement la transcription de cytokines pro-inflammatoires. On suppose également que le resvératrol empêche l'oligomérisation du récepteur du LPS TLR-4 [167]. Tous ces mécanismes sont illustrés à la figure 1.28.

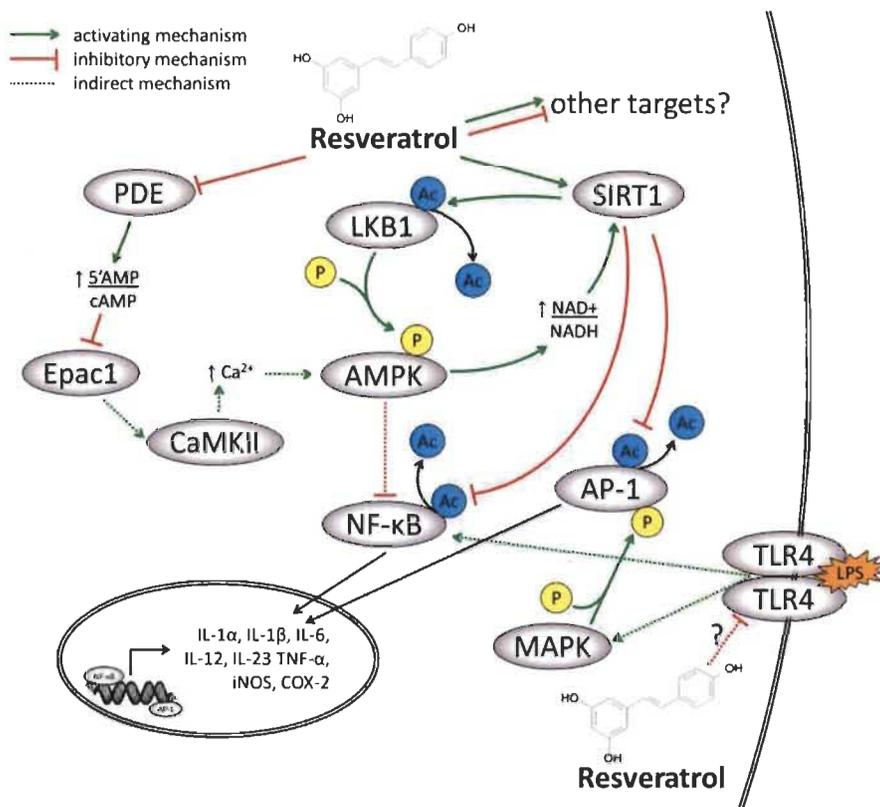


Figure 1.28 Mécanismes d'action du resvératrol dans la microglie [168].

1.8.1.3 Effet anticancéreux

Il existe dans la littérature une dualité dans l'impact de l'exposition cellulaire au resvératrol : de manière générale il peut favoriser la survie et la prolifération cellulaire, mais il a également été rapporté de nombreuses fois qu'il pouvait induire l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose. La prépondérance d'un effet par rapport à l'autre est attribuable à la dose utilisée et au type cellulaire étudié. L'utilisation de doses élevées augmente la production de ROS favorisant ainsi l'apoptose [169]. Aussi, les cellules cancéreuses, contrairement aux cellules neuronales, ont une activité mitotique très chaotique, ce qui pourrait expliquer pourquoi le resvératrol parvient à arrêter le cycle cellulaire au stade G1/S dans des cellules de cancer de la prostate [170]. De plus, ce polyphénol peut aussi causer la mort cellulaire dans des modèles de cancer du côlon et du sein [171,172]. Selon certaines études, ce processus serait dépendant de la présence de p53, car dans des cellules saines exprimant p53, de fortes doses de resvératrol permettent d'induire

l'apoptose tandis que dans des cellules saines sans p53, le resvératrol est incapable de causer la mort cellulaire [173].

1.8.2 Le trans- ϵ -viniférine (ϵ -viniférine)

L' ϵ -viniférine est un polyphénol de la classe des stilbènes qui est constitué d'un dimère de resvératrol (Figure 1.29). Comme le resvératrol, ce polyphénol se retrouve également dans les raisins rouges, notamment la variété *Vitis Vinifera* et est synthétisé par la plante pour son effet antifongique [174]. L' ϵ -viniférine se retrouve en plus grande quantité dans la pelure ou dans la tige du plant et son extraction est réalisée par chromatographie sur colonne [175]. Contrairement au resvératrol, on sait peu de choses sur les bienfaits de cette molécule. Les bienfaits connus de l' ϵ -viniférine sont son potentiel cardioprotecteur, anticancéreux et neuroprotecteur dans un modèle cellulaire de la maladie de Huntington (MH).

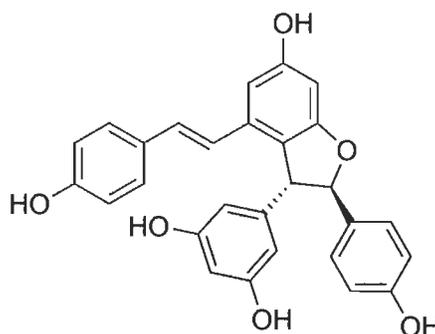


Figure 1.29 Structure du Trans- ϵ -viniférine.

1.8.2.1 Effet cardioprotecteur

Une étude comparative a démontré que l' ϵ -viniférine est plus efficace que son monomère, le resvératrol, pour améliorer le fonctionnement des cellules vasculaires endothéliales (VEC) du cœur dans des cas d'hypertension artérielle dans un modèle cellulaire porcin [176]. Dans des VEC provenant de rats, le traitement à l' ϵ -viniférine augmente la production de NO, un composé favorisant leur prolifération qui est un processus nécessaire à la réparation du tissu cardiaque

[177]. De plus, il y a augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes GPX et Cat qui peuvent neutraliser les ROS, des composés qui peuvent causer de l'hypertension [178]. Ainsi, en diminuant la quantité de ROS, l' ϵ -viniférine est capable de diminuer la pression artérielle.

1.8.2.2 Effet anticancéreux

Comme le resvératrol, l' ϵ -viniférine peut autant prévenir la mort cellulaire que l'induire. Une étude a été effectuée sur la lignée cellulaire de myélome multiple U266 exprimant une forme mutante de p53 : cette lignée qui produit constamment de l'IL-6 et est résistante à plusieurs agents anticancéreux [179]. L'administration de l' ϵ -viniférine sur cette lignée stoppe le cycle cellulaire à la phase G2/M et diminue le nombre de cellules qui sont à la phase G0/G1 [180]. De plus, il a été démontré que l' ϵ -viniférine cause la mort de ces cellules par une activation des caspases 2 et 8 qui provoquent un déséquilibre du potentiel de la membrane mitochondriale, ce qui active ensuite les mécanismes intrinsèques de l'apoptose [180].

1.8.2.3 Effet neuroprotecteur

Une étude a démontré que l' ϵ -viniférine a un potentiel neuroprotecteur dans un modèle cellulaire de la MH utilisant une lignée striatale mutante pour le gène de la huntingtine (Htt). Le mécanisme responsable de la perte sélective des neurones du striatum dans la MH n'est pas totalement élucidé, cependant, on pense qu'un dysfonctionnement mitochondrial et le stress oxydatif qui en résulte seraient des événements clés dans la progression de la maladie de Huntington (MH) [181-183]. De plus, on a remarqué une baisse de l'activité de la protéine mitochondriale sirtuine 3 (SIRT3) dans des cellules mutantes pour le gène Htt. Cette dernière active normalement, par déacétylation, des protéines clés du métabolisme et de la survie cellulaire. En effet, lorsqu'on provoque une délétion de SIRT3 chez la souris, une hyperacétylation de protéines comme la «diver kinase B» (LKB) ou la

SOD induit leur inactivation, causant un mal fonctionnement de la mitochondrie et la création de ROS [184]. La diminution de SIRT3 dans ce modèle est contrecarrée par un traitement à l' ϵ -viniférine, ce qui suggère un effet neuroprotecteur du composé [184].

Lorsqu'on traite des cellules striatales mutantes Htt à l' ϵ -viniférine, l'augmentation de l'activité de SIRT3 protège en effet le neurone de deux manières (Figure 1.30). Premièrement, SIRT3 active la SOD en la déacétylant, ce qui permet la baisse de ROS comme l' $O_2^{\cdot-}$. Deuxièmement, SIRT3 active LKB1 qui peut ensuite phosphoryler AMPK, une enzyme clé dans le métabolisme énergétique et le maintien du bon fonctionnement de la mitochondrie, ce qui empêche la production irrégulière de ROS ainsi que le débalancement de la membrane mitochondriale qui pourrait provoquer la sortie de facteurs apoptotiques comme le cytochrome C.

L' ϵ -viniférine n'a pas encore été testé dans les neurones dopaminergiques, mais on pense que ses ressemblances structurelles et fonctionnelles avec le resvératrol pourraient conférer à l' ϵ -viniférine des propriétés neuroprotectrices dans un modèle de la MP.

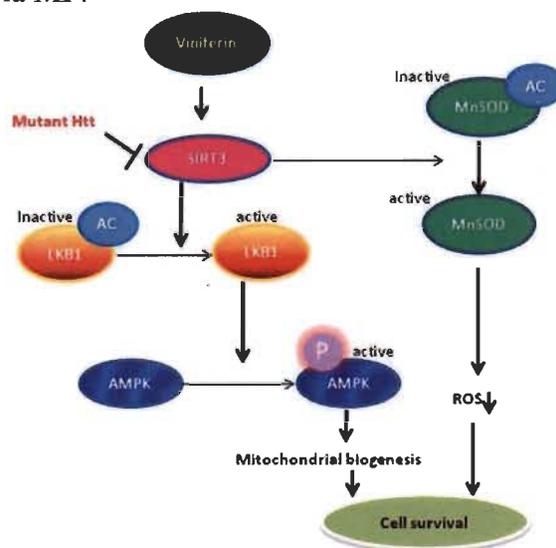


Figure 1.30 Effet neuroprotecteur de l' ϵ -viniférine dans un modèle cellulaire de la MH [185].

1.9 Hypothèses et objectifs de recherche

Mes travaux de recherche de maîtrise étaient divisés en deux volets orchestrés autour de deux hypothèses de recherche.

- 1) La première hypothèse de recherche était que l' ϵ -viniférine, seule ou en combinaison avec le resvératrol possède un effet neuroprotecteur dans l'étiologie de la MP liée au stress oxydatif. L'objectif général de ce premier volet de recherche était d'investiguer l'effet neuroprotecteur de l' ϵ -viniférine, seule ou en combinaison avec le resvératrol, protégeant les neurones PC12 de la mort cellulaire et de l'apoptose induite par un stress oxydatif obtenu en utilisant la toxine 6-OHDA. À ce propos, mes deux objectifs spécifiques étaient de vérifier si l' ϵ -viniférine pouvait :
 - a) Protéger les neurones PC12 de la mort cellulaire induite par un stress oxydatif causé par la 6-OHDA
 - b) Protéger les neurones PC12 de l'apoptose induite par un stress oxydatif causé par la 6-OHDA

- 2) La deuxième hypothèse de recherche était que l' ϵ -viniférine, seule ou en combinaison avec le resvératrol possède un effet anti-inflammatoire, dans l'étiologie de la MP liée à la neuroinflammation. L'objectif général de ce deuxième volet de recherche était de vérifier si l' ϵ -viniférine, seule ou utilisée en combinaison avec le resvératrol, possède un effet anti-inflammatoire baissant le potentiel inflammatoire de microglies N9 avant leur activation et protégeant les neurones PC12 de l'inflammation induite par des microglies N9 activées. Mes deux objectifs spécifiques étaient ainsi de vérifier si l' ϵ -viniférine pouvait :

- a) Baisser le potentiel inflammatoire de microglies N9 activées au LPS, protégeant ainsi les neurones PC12 dans un système de co-culture. Dans ce cas, les deux molécules végétales ont été administrées dans le milieu des cellules microgliales.

- b) Protéger les neurones PC12 de l'inflammation induite par des microglies N9 activées au LPS dans un système de co-culture. Dans ce cas, les molécules végétales ont été administrées dans le milieu des neurones PC12.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

À moins d'avis contraire, le matériel et les réactifs utilisés ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Ontario, Canada).

2.1 Culture cellulaire

Deux lignées cellulaires ont été utilisées dans ce projet de recherche : la lignée PC12 et la lignée N9. Les cellules PC12 sont des cellules cancéreuses provenant de phéochromocytomes de rat. Elles synthétisent des catécholamines, telles que la DA, l'adrénaline et la noradrénaline. Le traitement de ces cellules surreno-médullaires avec du facteur de croissance neuronal (NGF) permet des changements morphologiques et fonctionnels qui induisent leur différenciation en neurones. En effet, tel que démontré aux figures 2.1 et 2.2, les cellules PC12 arborent des prolongements neuronaux et expriment des marqueurs d'identité typiques des neurones DAergiques dont les neurofilaments (NF), la TH, qui est l'enzyme limitante dans la synthèse de la DA, le transporteur de la DA (DAT) et la protéine d'identité neuronale NeuN.

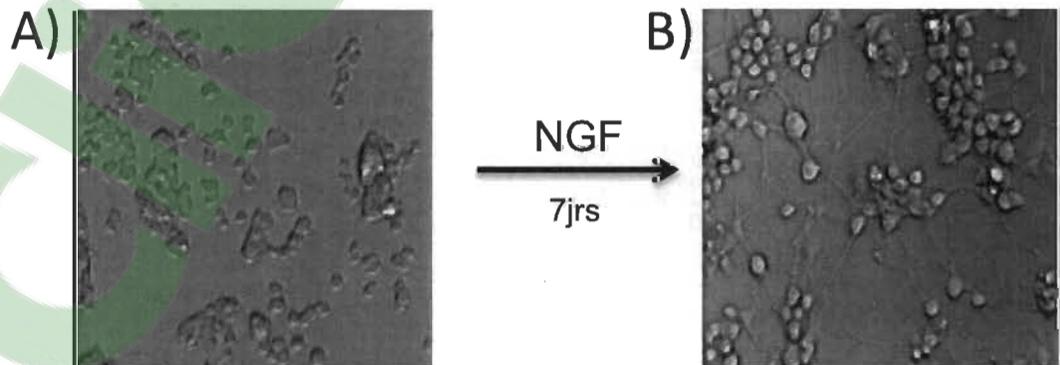


Figure 2.1 Les cellules PC12 non différenciées (A) et différenciées (B) suite à l'ajout de NGF (40x, lumière blanche).

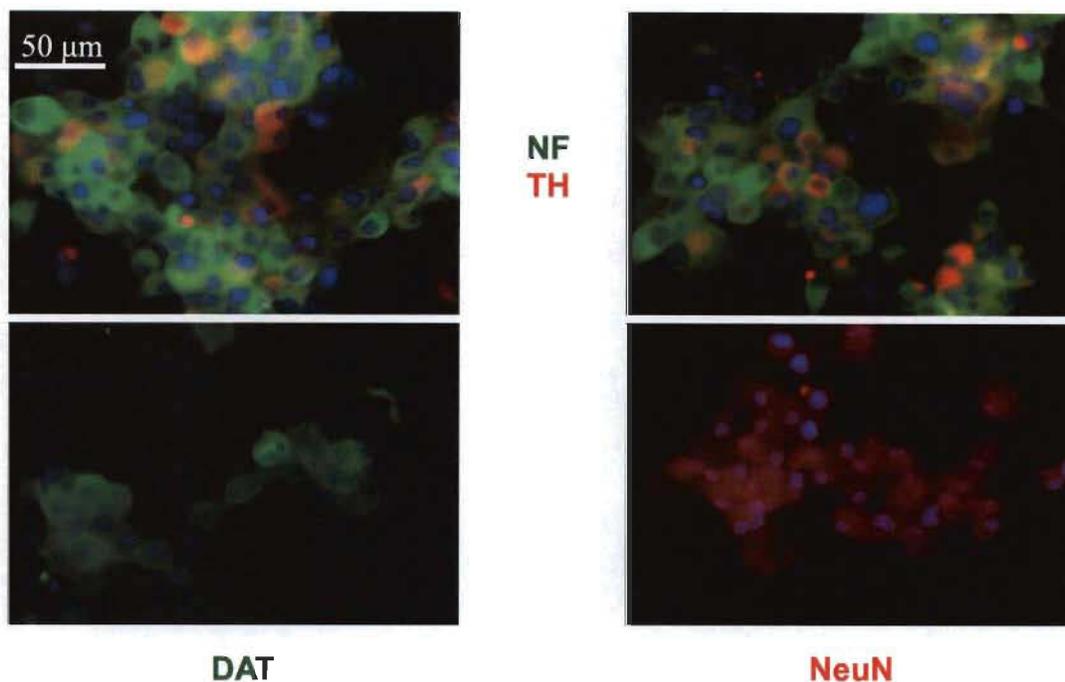


Figure 2.2 Les cellules PC12 différenciées présentent les marqueurs typiques des neurones DAergiques (40x, immunofluorescence).

Les cellules N9 sont une lignée microgliale murine immortalisée qui est utilisée couramment dans les études sur les problèmes neurodégénératifs ayant une composante inflammatoire. Ces cellules sont reconnues entre autres pour réagir avec des endotoxines comme le LPS, permettant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'interféron gamma (IFN- γ) [186], l'interleukine-1beta (IL-1 β) et le TNF- α [187], faisant de ces cellules un outil pour expérimenter la neuroinflammation *in-vitro* dans des modèles comme la co-culture.

Les cellules PC12 (ATCC) et N9 (fournies par le Dr L. Vallières [CHUL, Québec, Canada]) ont été cultivées à l'intérieur de flasques conditionnés au collagène dans un incubateur à 37 °C et 5 % de CO₂. Le milieu de culture utilisé pour les cellules PC12 était du *Roswell Park Memorial Institute-1640* (RPMI-1640) sans phénol rouge supplémenté de 5 % de sérum bovin fœtal (FBS) et de 10 % de sérum de cheval (HS). La différenciation des cellules PC12 en neurones fut induite par du NGF (75 η g/ml) dans du milieu RPMI-1640 supplémenté de 1 % de FBS pendant 7 jours. Pendant les expériences avec les neurones PC12, le milieu de culture a été changé pour du milieu de traitement

PC12 (99% RPMI-1640 et 1% FBS). La croissance des cellules microgliales N9 a été effectuée dans du milieu *Dulbecco's Modified Eagle's Medium-F12* (DMEM-F12) supplémenté de 10 % de HS. Pendant les expériences avec les microglies N9, le milieu de culture a été changé pour du milieu de traitement N9 (99% DMEM-F12 et 1% HS). Selon l'expérience, les plaques utilisées sont des multi-puits 24 ou 96 puits ainsi que des pétris tous conditionnés au collagène. Tous les sérums ont été traités à la chaleur (pour inactiver le complément lors des expérimentations) et tous les milieux ont été changés aux 2-3 jours.

Lors des expériences pour le volet neuroinflammation, un système de co-culture cellulaire microglies N9 – neurones PC12 a été élaboré. Tout d'abord, des neurones PC12 ont été mis en culture dans des plaques 24 puis préalablement conditionnés avec du collagène, tandis que des microglies N9 ont été mises en culture dans des inserts. Les inserts possèdent une membrane semi-perméable en polyéthylène contenant des pores de $0,4 \mu\text{m}$, permettant ainsi le passage de facteurs cellulaires comme les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par des microglies activées sans qu'il y ait de contact direct entre les deux populations cellulaires concernées. Le système de co-culture est illustré plus en détail dans la figure 2.3.

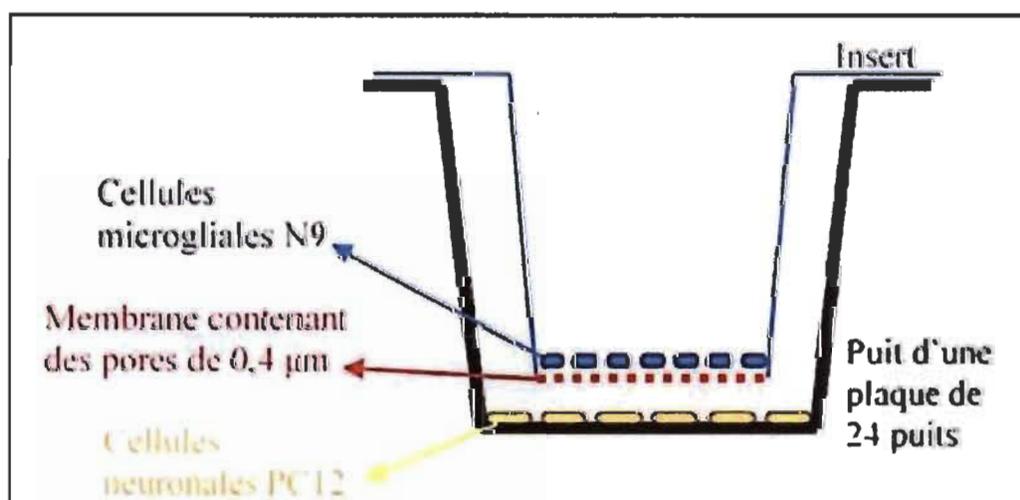


Figure 2.3 Le système de co-culture microglie-neurone.

2.2 Traitements cellulaires

Pour évaluer l'effet des polyphénols sur le stress oxydatif et l'apoptose, des neurones PC12 ont été prétraités pendant trois heures avec du milieu de traitement (condition contrôle) ou avec du resvératrol, de l' ϵ -viniférine ou un mélange des deux, à des concentrations de 10^{-7} M, 10^{-9} M et 10^{-12} M, pour ensuite être traitées avec du milieu de traitement (condition contrôle) ou avec la neurotoxine pro-oxydante 6-OHDA, à une concentration finale de 50 μ M, pour une période de 24 heures. Suite à cela, les cellules ont été utilisées pour :

- Quantifier les taux de mort et de survie cellulaires via des dosages de la lactate déshydrogénase (LDH) et du sel de bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium (MTT), respectivement, tel que décrit plus en détail dans la section 2.4.
- Détecter, par immunofluorescence, des éléments cellulaires clés de l'apoptose, soit la protéine Caspase-3 clivée et la fragmentation apoptotique de l'ADN, tel que décrit plus en détail dans la section 2.5.
- Extraire les protéines totales en vue d'une électrophorèse et d'un immunobuvardage de type «Western» (WB) permettant de détecter les protéines indicatrices de l'apoptose Caspase-3 clivée et PARP-1 clivée, tel que décrit plus en détail dans la section 2.6.

Dans le système de co-culture, les microglies N9 ou les neurones PC12 ont été prétraités pendant trois heures avec du milieu de traitement N9/PC12 ou avec du resvératrol, de l' ϵ -viniférine ou un mélange des deux à une concentration de 10^{-9} M. Les microglies ont ensuite été activées avec du milieu de traitement N9 ou une solution de LPS (2 μ g/ml) pendant 24 heures. Puis, les inserts contenant les microglies activées ont été transférés pour être placés au-dessus des neurones PC12, et ce, pour un autre 24 heures. Suite à ce traitement, les cellules ont été utilisées pour :

- Quantifier les taux de mort et de survie cellulaire via des dosages LDH et MTT, respectivement, tel que décrit plus en détail dans la section 2.4.
- Détecter, par immunofluorescence, des éléments clés de l'apoptose, soit la protéine Caspase-3 activée et la fragmentation apoptotique de l'ADN, tel que décrit plus en détail dans la section 2.5.

2.3 Mesure de la mortalité et de la survie cellulaire

La mort cellulaire des neurones soumis à divers traitements a été quantifiée par dosage colorimétrique avec le kit «LDH Cytotoxicity Assay Kit» (Thermo Scientific) qui permet de doser la quantité de LDH qui est présente dans le milieu de culture. La quantité d'enzyme est en lien direct avec la proportion de cellules déjà lysées ou en voie de l'être [188]. Suite aux traitements décrits précédemment et à la centrifugation (250 g à température pièce) des cellules dans une plaque 96 puits, 50 µl du surnageant ont été prélevés et mélangés à 50 µl d'une solution contenant du lactate, du NAD⁺ et un sel de tétrazolium. La LDH présente dans le surnageant convertira le lactate et le NAD⁺ en NADH et en pyruvate. Ce NADH provoquera la réduction du sel de tétrazolium incolore en sel de formazan coloré rouge. La lecture de l'absorbance à 492 nm a été faite sur un lecteur de microplaques Multiskan Ascent (Thermo Scientific). La réaction colorimétrique est illustrée plus en détail à la figure 2.4.

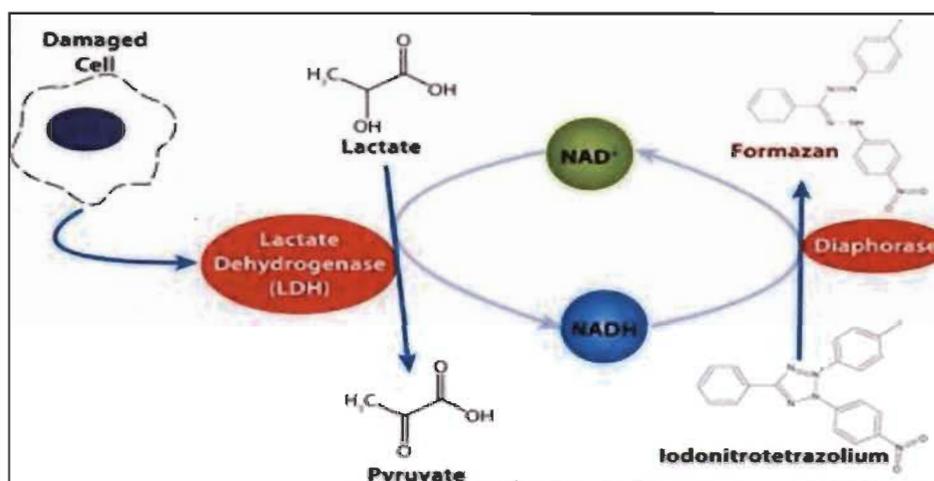


Figure 2.4 Réaction colorimétrique pour déterminer l'activité de la LDH afin d'évaluer la mortalité cellulaire.

Les niveaux de cytotoxicité ont été déterminés grâce à des valeurs contrôles extrêmes. Le contrôle maximum de mort cellulaire a été déterminé en utilisant des cellules traitées avec un tampon de lyse (fourni avec le kit), tandis que le contrôle minimum consistait en seulement du milieu de traitement. Le taux de mort cellulaire a été calculé comme suit :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{(\text{Valeur expérimentale} - \text{Contrôle minimum})}{(\text{Contrôle maximum} - \text{Contrôle minimum})} \times 100$$

La survie cellulaire a été quantifiée par un dosage colorimétrique basé sur la réduction du MTT en un précipité de formazan mauve, par la succinate déshydrogénase présente dans la mitochondrie des neurones encore métaboliquement actifs [189]. En effet, lorsque le MTT réagit avec la succinate déshydrogénase, un précipité mauve se forme dans les mitochondries : ce précipité peut être solubilisé ce qui confère une coloration mauve au surnageant dont l'intensité peut être ensuite dosée.

Suite aux traitements, les cellules ont été centrifugées (250 g à température pièce) dans une plaque 96 puits et 5 µl de la solution de MTT (5 mg/ml, diluée

dans du phosphate buffer saline (PBS) et filtrée sur membrane 0,22 μm) a été ajoutée dans chaque puits. Les cellules ont été ensuite incubées quatre heures dans un environnement humide (37 °C, 5 % CO_2) avant d'ajouter 50 μl d'une solution de solubilisation (10 % sodium dodecyl sulfate dans une solution de 0,01 M d'acide chlorhydrique) afin de lyser les cellules et de libérer le précipité contenu dans les mitochondries. Seize heures plus tard, l'absorbance à 595 nm a été lue sur un lecteur de microplaques Multiskan Ascent (Thermo Scientific). Cette réaction colorimétrique est illustrée à la figure 2.5.

Les niveaux de survie cellulaire ont été également déterminés grâce à des valeurs contrôles extrêmes. Les contrôles maximaux et minimaux sont les mêmes que ceux utilisés lors du test LDH et le taux de survie cellulaire a été calculé de la même manière.

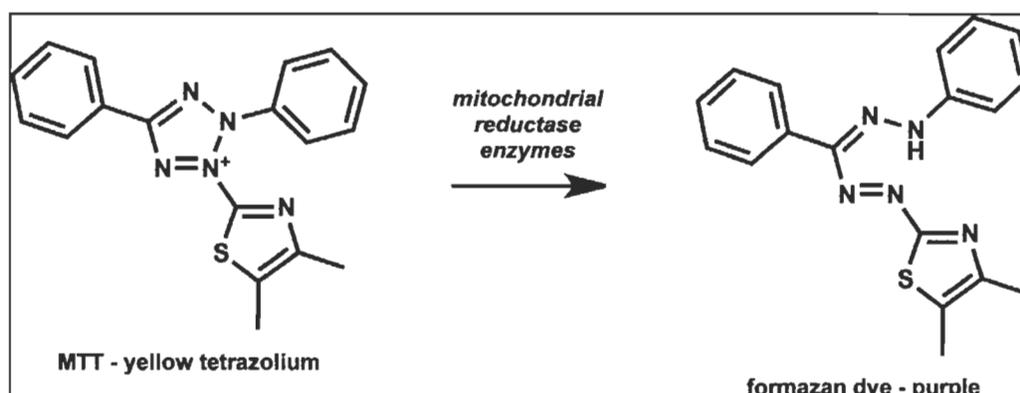


Figure 2.5 Réaction colorimétrique de réduction du MTT utilisée pour évaluer la survie cellulaire.

2.4 Détection de l'apoptose par microscopie à fluorescence

Tel que décrit précédemment, les cellules PC12 ont été ensemencées sur des lamelles de verre recouvertes de poly-L-lysine. Suite aux traitements, les cellules ont été fixées avec une solution de paraformaldéhyde 4 % dans du PBS 1X pendant 15 minutes à 37 °C. Ensuite, les neurones ont subi une perméabilisation et un blocage au «Fish Skin Gelatin Buffer» (FSGB; Solution mère 45 % dilué 1:250

dans du «Tris-buffer saline» [TBS]) à température pièce pendant 30 minutes. Un deuxième traitement de blocage de signal non-spécifique a été réalisé avec une solution de PBS contenant 5 % de sérum de chèvre pour une durée de 30 minutes à température pièce. Pour identifier la présence de la protéine apoptotique Caspase-3 clivée, les cellules ont été incubées avec un anticorps primaire anti-Caspase-3 clivée dilué 1:500 à 4 °C pendant toute la nuit et un anticorps secondaire anti-lapin couplé au chromophore Cy-3 dilué 1:500 pendant une heure à 4 °C.

La présence de la fragmentation apoptotique de l'ADN a été détectée par un test TUNEL grâce au kit «In-situ Cell Death Detection Kit» (Roche). Chaque lamelle a été incubée avec 25 µl d'une solution de marquage 1x dUTP-fluorescéine (dilué dans une solution 10x de terminal deoxynucléotidyl transférase) pendant 1 heure dans une atmosphère humide (37 °C, 5 % CO₂) à l'abri de la lumière. Ensuite, le marquage des noyaux s'est fait avec une solution de Hoescht (5 µg/ml) pendant 10 minutes à 37 °C. Finalement, le montage des lamelles sur des lames de microscope s'est fait avec de l'immu-mount. Une cellule était considérée apoptotique lorsqu'elle était doublement marquée pour la Caspase-3 clivée et la fragmentation de l'ADN. Les lames ont été observées avec un microscope confocal (Leica DMI 6000 CS) connecté à une caméra (Leica TCS SP8) en utilisant le logiciel LAS AF (Leica). Le taux de cellules apoptotiques, observées dans dix champs optiques déterminés au hasard, a été calculé en faisant le rapport entre le nombre de cellules marquées sur le nombre total de cellules (en %).

2.5 Immunobuvardage de type «Western»

Suite aux traitements des neurones PC12, dans des Pétris de 58,1 cm² (Falcon), l'extraction des protéines totales s'est faite avec le kit «Nuclear Extraction Kit» (Active Motif). Le dosage des protéines a été effectué à l'aide du «BCA Protein Assay Kit» (Thermo Scientific). Des quantités égales de protéines ont été déposées dans chacun des puits d'un gel de polyacrylamide 12 %. Ensuite,

une électrophorèse (30 minutes à 70 volts puis 90 minutes à 120 volts) a permis la séparation des protéines selon leur poids moléculaire. Par la suite, le transfert (75 minutes à 300 mA) a été fait sur une membrane de polyvinylidene difluoride (pores de 0,2 μm). Les membranes ont été bloquées 45 minutes dans une solution maison de Blotto B (5 % de lait en poudre dans du «Tris-buffed saline and tween 20» [TBST]). Les membranes ont été incubées toute la nuit à 4 °C avec un anticorps anti-Caspase-3 clivée dilué 1:500, un anticorps anti-PARP-1 clivée dilué 1:500 ou un anticorps anti- β -actine dilué 1:500. Le jour suivant, les membranes ont été lavées 4 fois 10 minutes puis incubées 45 minutes avec un anticorps secondaire couplé avec une peroxydase diluée 1:2500. La révélation des membranes s'est faite avec le kit «SuperSignal West Femto Maximum Sensitive Substrate» (Thermo Scientific) et les photos ont été prises avec une caméra à chimioluminescence (Alpha Innotech) utilisant le logiciel AlphaEase FC (FluorChem). L'analyse densitométrique s'est effectuée avec le logiciel image J en utilisant l'expression de la β -actine comme contrôle interne.

2.6 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test One-way ANOVA avec un post-test Tukey à l'aide du logiciel GraphPad (Instat, version 3,06). Toutes les valeurs sont des moyennes de trois expériences indépendantes \pm SEM.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Rétrospective des expérimentations effectuées dans ce mémoire

Beaucoup d'expérimentations ont été effectuées avant d'avoir les résultats qui sont présentés dans cette section. Avant toute chose, je tiens à dire que les cellules PC12, qui m'ont servi de modèle neuronal DAergique, sont des cellules très difficiles à mettre en culture et se décollent facilement. N'ayant pas fait de stage de recherche à la fin de mon baccalauréat, j'ai eu une période d'adaptation pour maîtriser la délicatesse requise pour la culture cellulaire.

D'abord, il a fallu déterminer la bonne concentration de collagène à utiliser pour garder mes cellules en culture, quelle toxine utiliser ainsi que sa concentration (6-OHDA ou MPP⁺) et quelle concentration de polyphénols utiliser. Ensuite, il était indispensable de caractériser le phénotype neuronal dopaminergique de mon modèle cellulaire, en utilisant les anticorps NF, TH et DAT en immunofluorescence, tel que démontré aux figures 2.1 et 2.2 dans la section Matériel et Méthodes. De plus, le test LDH, qui a été effectué au début, suivant des recettes mises au point au laboratoire par d'autres étudiants, a donné des résultats très variables. Nous avons donc décidé de faire les tests présentés ici avec un ensemble commercial. Finalement, les seuls paramètres du modèle expérimental qui ont été préétablis sont la durée des prétraitements (3 heures) et des traitements (24 heures) qui ont été standardisés dans notre laboratoire.

Deuxièmement, pour les expériences sur l'apoptose, certains problèmes ont été rencontrés. Notamment, pour les expériences d'immunofluorescence, la densité cellulaire a dû être optimisée pour qu'il y ait le minimum de cellules PC12 décollées sans que la différenciation cellulaire ne soit pénalisée.

Pour les WB, au départ, les cellules ont été encemencées dans les plaques 6 puits, mais il n'y avait pas assez de protéines lors de l'extraction. Comme je ne pouvais pas augmenter la densité cellulaire dans ce cas, sous peine d'affecter la différenciation cellulaire, j'ai décidé d'ensemencer les cellules dans des pétris.

3.2 Dose-réponse de l'effet neuroprotecteur d' ϵ -viniférine sur les neurones PC12

Dans le but d'évaluer la concentration optimale d' ϵ -viniférine à utiliser seule ou en association avec le resvératrol, des tests LDH et MTT ont été effectués pour doser la mort (Figure 3.1) et la survie cellulaire (Figure 3.2), respectivement, de neurones PC12 prétraités 3 heures avec du milieu de traitement PC12 ou avec de l' ϵ -viniférine ou un mélange ϵ -viniférine/resvératrol, puis traités 24 heures avec du milieu de traitement PC12 ou avec la neurotoxine 6-OHDA. Pour ces expériences de dose-réponse, trois concentrations considérées physiologiques ont été utilisées pour les polyphénols, soit 10^{-7} M, 10^{-9} M et 10^{-12} M, tel que déjà optimisé dans notre laboratoire.

Lorsque le polyphénol ϵ -viniférine est utilisé seul, un prétraitement à la concentration 10^{-9} M démontre une baisse de la cytotoxicité de 20 % (Figure 3.1B) et une hausse de la survie cellulaire de 14 % (Figure 3.2B) comparativement à des neurones PC12 prétraités avec du milieu de traitement PC12 et traités avec la 6-OHDA. Cet effet n'est pas observé aux concentrations 10^{-7} M (Figures 3.1A et 3.2A) et 10^{-12} M (Figures 3.1C et 3.2C). Cet effet biphasique sera expliqué plus en détail dans la discussion.

Lorsque les polyphénols resvératrol et ϵ -viniférine sont utilisés en combinaison, aux trois concentrations testées, soit 10^{-7} M, 10^{-9} M et 10^{-12} M, il y a une baisse respective de la mortalité cellulaire de 23 %, 28 % et 36 % comparativement à des neurones PC12 prétraitées avec du milieu de traitement PC12 et traités avec la 6-OHDA (Figure 3.1A, B et C). Aussi, il y a augmentation de la survie cellulaire de 21 %, 26 % et 34 % respectivement (Figure 3.2A, B et C). Donc lorsqu'on compare ces résultats avec ceux provenant de deux polyphénols utilisés seuls, l'effet est plus prononcé dans le cas d'un prétraitement combiné resvératrol/ ϵ -viniférine. Ces résultats montrent que l' ϵ -viniférine lorsqu'utilisée seule, à une concentration de 10^{-9} M, ou en combinaison avec le resvératrol, à des concentrations de 10^{-7} M, 10^{-9} M ou 10^{-12} M, induit des mécanismes cellulaires de protection des neurones PC12 contre la mort cellulaire induite par la 6-OHDA. Puisque seule la concentration de 10^{-9} M démontre un effet protecteur lorsque l' ϵ -viniférine est utilisée, c'est cette condition qui a été conservée pour la suite des expériences.

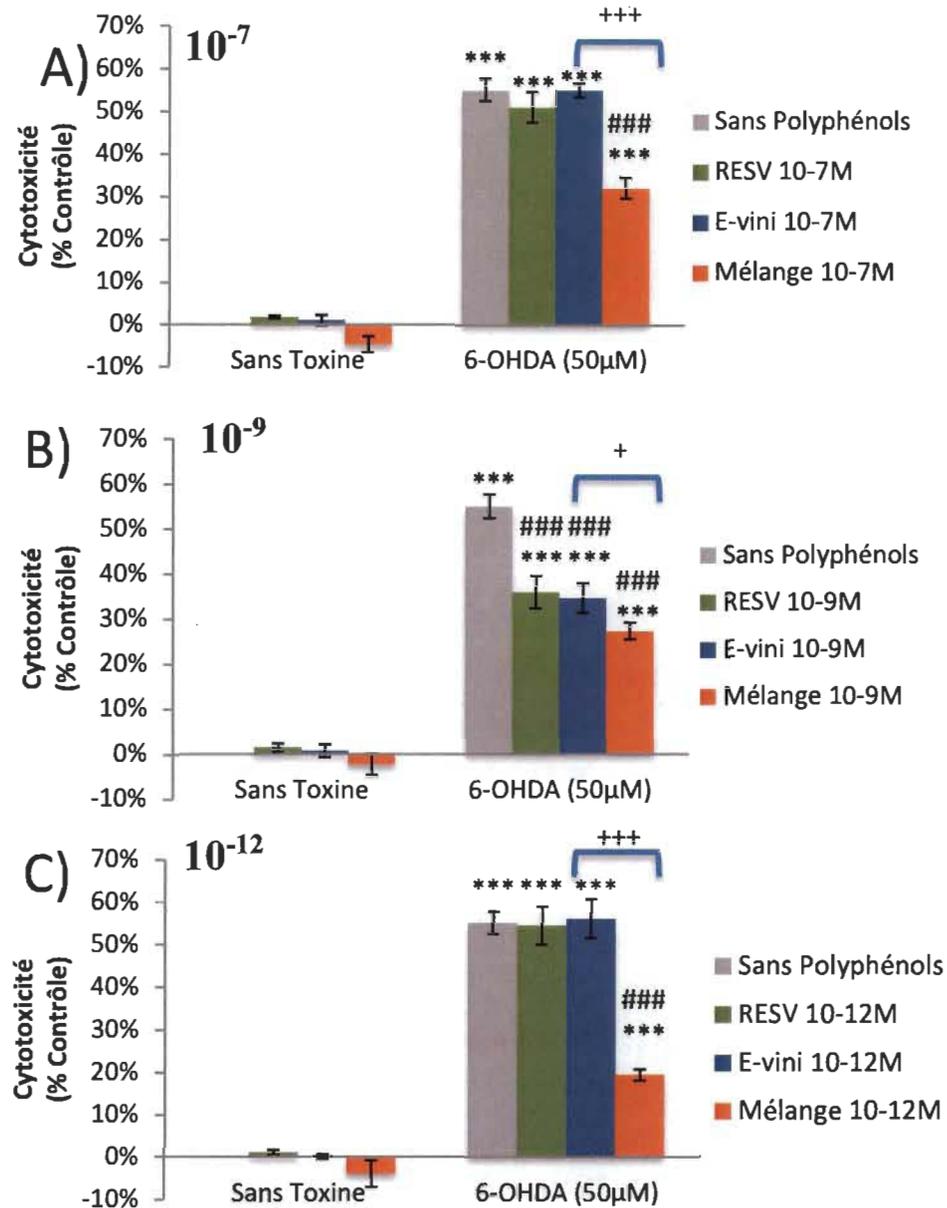


Figure 3.1 Dosage de la mort cellulaire par test LDH de neurones PC12 prétraités 3 heures avec du milieu de traitement PC12 ou de l' ϵ -viniférine seule ou mélangée avec du resvératrol puis traités 24 heures avec de la 6-OHDA ou du milieu de traitement PC12. Les polyphénols ont été utilisés à des concentrations de 10^{-7} M (A), 10^{-9} M (B) et 10^{-12} M (C). ### p<0,001, ## p<0,01 et # p<0,05 lorsque comparé à la condition «Sans polyphénols + 6-OHDA 50 μ M» et *** p<0,001, ** p<0,01 et * p<0,05 lorsque comparé à la condition «Sans polyphénols + Sans Toxine». +++ p<0,001, ++ p<0,01 et + p<0,05 lorsque comparé à la condition «E-vini + 6-OHDA 50 μ M»

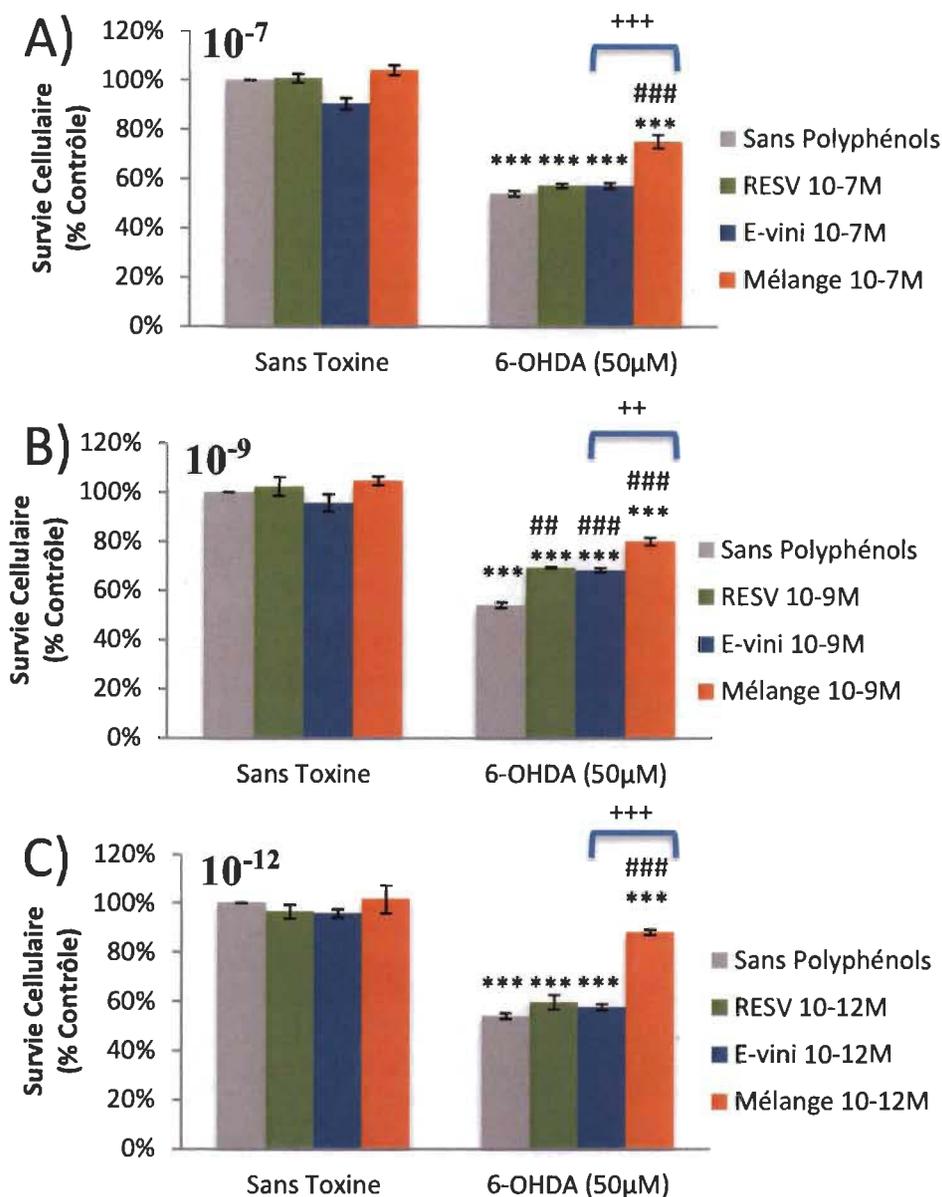


Figure 3.2 Dosage de la survie cellulaire par test MTT de neurones PC12 prétraitées 3 heures avec du milieu de traitement PC12 de l'ε-viniférine seule ou mélangée avec du resvératrol, puis traitées 24 heures avec de la 6-OHDA ou du milieu de traitement PC12. Les polyphénols ont été utilisés à des concentrations de 10⁻⁷M (A), 10⁻⁹M (B) et 10⁻¹²M (C). ### p<0,001, ## p<0,01 et # p<0,05 lorsque comparé à la condition «Sans polyphénols + 6-OHDA 50µM» et *** p<0,001, ** p<0,01 et * p<0,05 lorsque comparé à la condition «Sans polyphénols + Sans Toxine». +++ p<0,001, ++ p<0,01 et + p<0,05 lorsque comparé à la condition « E-vini + 6-OHDA 50µM»

3.3 L' ϵ -viniférine, seule ou en combinaison avec le resvératrol, diminue le taux de neurones PC12 apoptotiques

Afin de déterminer si l' ϵ -viniférine seule ou utilisée en association avec le resvératrol peut protéger des neurones PC12 de l'apoptose induite par la 6-OHDA, des neurones PC12 ont été prétraités trois heures avec du milieu de traitement PC12 ou avec l' ϵ -viniférine ou un mélange ϵ -viniférine/resvératrol, puis traités 24 heures avec du milieu de traitement PC12 ou avec la 6-OHDA. Après le traitement, les cellules ont été fixées et marquées, par immunofluorescence (Figure 3.3A), pour détecter la protéine Caspase-3 clivée (en rouge) et la fragmentation apoptotique de l'ADN (par test TUNEL, en vert), deux éléments qui ensemble sont indicatifs de l'apoptose. Les noyaux ont été marqués en bleu grâce au marqueur d'acides nucléiques Hoescht. Le montage des lames s'est fait avec de milieu de montage Immu-mount. La figure 3.3 A illustre qu'un prétraitement avec le polyphénol ϵ -viniférine parvient à diminuer significativement le nombre de cellules apoptotiques comparativement à des neurones prétraités avec du milieu de traitement PC12 et traités avec la 6-OHDA. De plus, cet effet est de plus grande amplitude lorsque le prétraitement est effectué avec un mélange ϵ -viniférine/resvératrol.

La figure 3.3B montre le taux de cellules apoptotiques qui a été déterminé en effectuant le rapport entre le nombre de cellules doublement positives Caspase-3 clivée et TUNEL sur le nombre de cellules totales dénombrées dans 10 champs optiques déterminés au hasard lors de l'observation des lames au microscope confocal. Comparativement à des neurones prétraités avec du milieu de traitement PC12 et traités avec la 6-OHDA, ce taux diminue de 26 % lorsque l' ϵ -viniférine est utilisé en prétraitement et il diminue de 37 % quand on y ajoute du resvératrol. Ces résultats montrent que l'utilisation du polyphénol ϵ -viniférine seul ou en association avec le resvératrol parvient à protéger les neurones PC12 de la mort cellulaire par apoptose induit par l'ajout de 6-OHDA.

A)

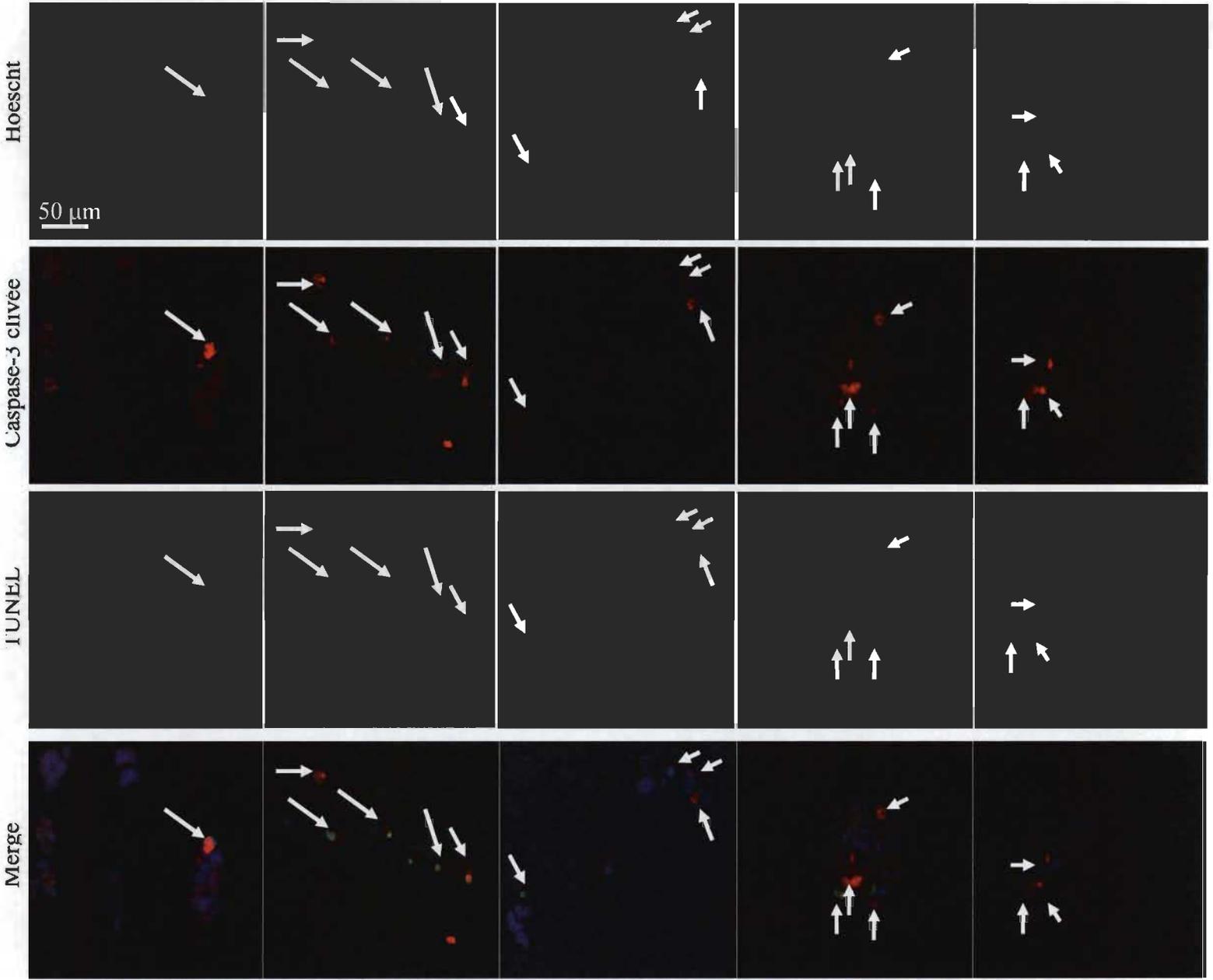
Sans Polyphénols et
sans 6-OHDA

6-OHDA

Resvératrol +
6-OHDA

ϵ -viniférine +
6-OHDA

Mélange+
6-OHDA



B)

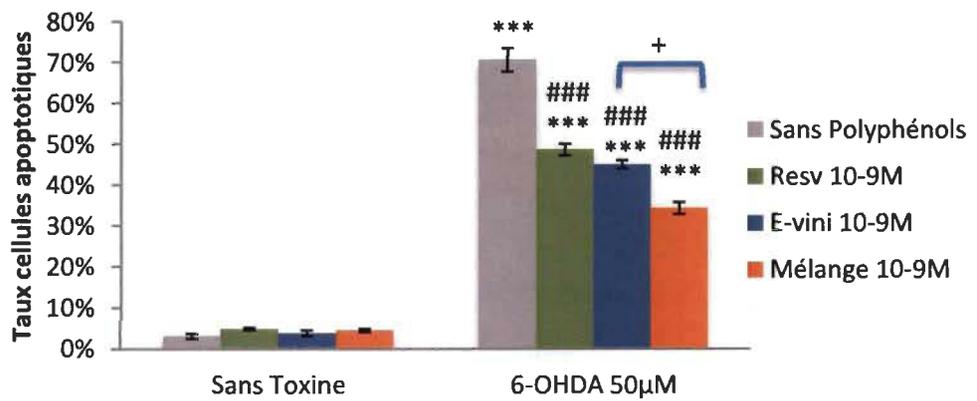


Figure 3.3 Détection par immunofluorescence de l'apoptose (A) et taux de cellules apoptotiques (B) de neurones PC12 prétraitées avec du milieu de traitement PC12, de l' ϵ -viniférine seule ou mélangée avec du resvératrol, puis traitées avec de la 6-OHDA ou du milieu de traitement PC12. Les images en A ont été prises à grossissement 40x. ### p<0,001, ## p<0,01 et # p<0,05 lorsque comparé à la condition «Sans polyphénols + 6-OHDA 50 μ M» et *** p<0,001, ** p<0,01 et * p<0,05 lorsque comparé à la condition «Sans polyphénols + Sans Toxine». +++ p<0,001, ++ p<0,01 et + p<0,05 lorsque comparé à la condition «E-vini + 6-OHDA 50 μ M»

3.4 L' ϵ -viniférine seule ou en combinaison avec le resvératrol diminue le niveau des protéines indicatrices de l'apoptose Caspase-3 clivée et PARP-1 clivée dans des neurones PC12 traitées à la 6-OHDA

Pour approfondir les résultats sur le potentiel anti-apoptotique de l' ϵ -viniférine, des immunobuvardages «Western» ont été effectués afin de mesurer les niveaux des protéines indicatrices de l'apoptose Caspase-3 clivée (Figure 3.4A) et PARP-1 clivée (Figure 3.4B) dans des neurones PC12 prétraitées trois heures avec du milieu de traitement PC12 ou avec de l' ϵ -viniférine ou un mélange ϵ -viniférine/resvératrol, puis traitées 24 heures avec du milieu de traitement PC12 ou avec la 6-OHDA. Les résultats ont été exprimés sous forme d'un ratio de l'intensité des bandes par rapport à l'intensité de la bande correspondant à la β -actine dans le même échantillon. La figure 3.4 montre qu'un prétraitement de trois heures avec le polyphénol ϵ -viniférine avant l'ajout de la neurotoxine 6-OHDA permet de réduire le ratio de niveau d'expression de ces protéines. Dans le cas de la protéine Caspase-3 clivée, le ratio passe de 0,27 dans des cellules prétraitées avec du milieu de traitement PC12 et traitées avec de la 6-OHDA à 0,21 dans des cellules ayant reçu un prétraitement à l' ϵ -viniférine et un traitement à la 6-OHDA. Pour la protéine PARP-1 clivée le ratio passe de 0,25 à 0,19. Cet effet est amplifié lors d'un prétraitement ϵ -viniférine/resvératrol. Pour Caspase-3 clivée, le ratio d'expression passe de 0,27 dans des cellules prétraitées avec du milieu de traitement PC12 et traitées avec de la 6-OHDA à 0,18 dans des cellules ayant reçu un prétraitement ϵ -viniférine/resvératrol et un traitement à la 6-OHDA. Tandis que dans le cas de PARP-1 clivée, le rapport passe de 0,25 à 0,15. Ces résultats supportent les conclusions apportées à la figure 3.3.

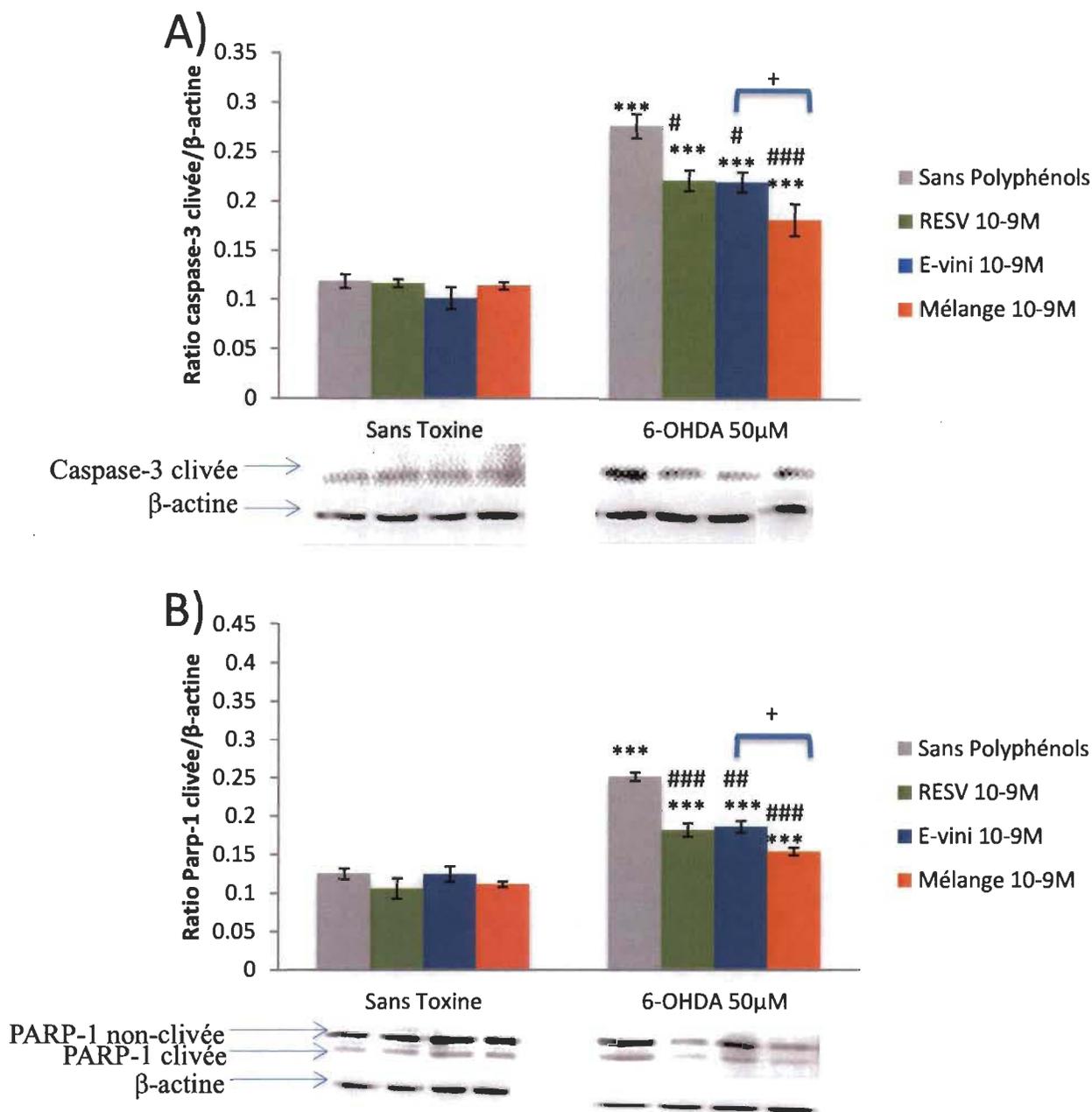


Figure 3.4 Ratio des protéines indicatrices de l'apoptose Caspase-3 clivée (A) et PARP-1 clivée (B) dans des neurones PC12 prétraitées 3 heures avec du milieu de traitement PC12 ou de l'*e*-viniférine seule ou mélangée avec du resvératrol, puis traitées 24 heures avec de la 6-OHDA ou du milieu de traitement PC12.

$p < 0,001$, ## $p < 0,01$ et # $p < 0,05$ lorsque comparé à la condition «Sans polyphénols + 6-OHDA 50 μ M» et *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ et * $p < 0,05$ lorsque comparé à la condition «Sans polyphénols + Sans Toxine». +++ $p < 0,001$, ++ $p < 0,01$ et + $p < 0,05$ lorsque comparé à la condition «E-vini + 6-OHDA 50 μ M»

3.5 L' ϵ -viniférine seule ou utilisée en combinaison avec le resvératrol baisse le potentiel inflammatoire de microglies N9 activées dans un contexte de co-culture microglie-neurone

Dans le but de déterminer si l' ϵ -viniférine a un effet anti-inflammatoire sur un autre type de cellules du cerveau que l'on croit impliquées dans la MP, des cellules microgliales N9 ont été prétraitées trois heures avec du milieu de traitement N9 ou avec de l' ϵ -viniférine ou un mélange ϵ -viniférine/resvératrol avant d'être activées 24 heures par du LPS. Dans le cas de la condition contrôle, c'est du milieu de traitement N9 qui a été ajouté à la place du LPS. Puis, la production de médiateurs pro-inflammatoires sécrétés dans le milieu de culture a été étudiée par la mise en co-culture avec des neurones PC12. 24 heures plus tard, le taux de mort cellulaire des neurones a été dosé par le test LDH. La figure 3.5 montre que lorsque les microglies N9 sont prétraitées avec de l' ϵ -viniférine, il y a une baisse de 51 % de la mort cellulaire au niveau des neurones PC12 comparativement à des neurones qui ont été mis en co-culture avec des cellules microgliales N9 activées et prétraitées seulement avec du milieu de traitement N9. De plus, lorsque l' ϵ -viniférine est utilisé en combinaison avec du resvératrol on observe une baisse de la mort cellulaire de 64 %. Ces observations montrent que l' ϵ -viniférine, seule ou mélangée avec du resvératrol, peut réduire le potentiel inflammatoire des microglies juste avant leur activation, protégeant les neurones PC12 dans un contexte de co-culture. Finalement, cet effet est plus prononcé dans le cas d'un prétraitement ϵ -viniférine/resvératrol.

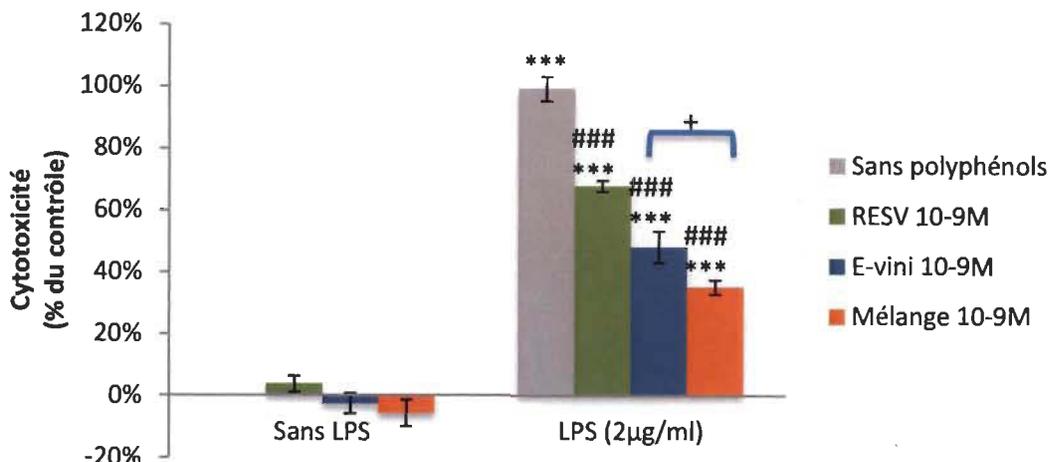


Figure 3.5 Dosage, par le test LDH, de la mort cellulaire de neurones PC12 mis en co-culture avec des microglies N9 prétraitées 3 heures avec du milieu de traitement N9 ou de l' ϵ -viniférine seule ou mélangée avec du resvératrol puis activées 24 heures au LPS ou du milieu de traitement N9. ### p<0,001, ## p<0,01 et # p<0,05 lorsque comparé à la condition «Sans polyphénols + LPS 2ug/ml » et *** p<0,001, ** p<0,01 et * p<0,05 lorsque comparé à la condition «Sans polyphénols + Sans LPS». +++ p<0,001, ++ p<0,01 et + p<0,05 lorsque comparé à la condition « E-vini + LPS 2ug/ml »

3.6 Évaluation de l'effet anti-apoptotique d'un prétraitement avec de l' ϵ -viniférine seule ou utilisée en combinaison avec le resvératrol sur des microglies N9 activées dans une co-culture microglie-neurone

Après le traitement expliqué au point 3.4, les cellules ont été fixées et marquées, par immunofluorescence (Figure 3.6), pour détecter la protéine Caspase-3 clivée (en rouge) et la fragmentation apoptotique de l'ADN (par test TUNEL, en vert), deux éléments qui ensemble sont indicatifs de l'apoptose. Les noyaux ont été marqués en bleu grâce au marqueur d'acides nucléiques Hoescht. Le montage des lames s'est fait avec de milieu de montage Immu-mount. Comme l'illustre la figure 3.6, la mort cellulaire induite par neuroinflammation ne serait pas de l'apoptose. Cependant ces résultats ne sont que qualitatifs (les photos n'ont été prises que pour une expérience) et nécessiterait la prise d'autres photos pour obtenir des résultats concrets. Néanmoins, une hypothèse spéculant sur l'explication de ces résultats sera élaborée plus en détails dans la discussion.

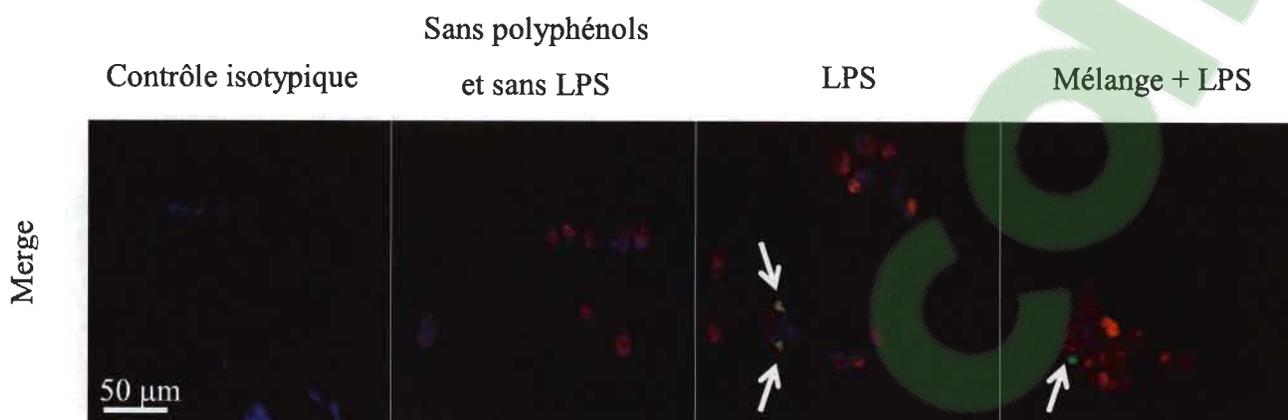


Figure 3.6 Détection par immunofluorescence de l'apoptose de neurones PC12 mis en co-culture avec des microglies N9 prétraitées 3 heures avec du milieu de traitement N9 ou de l' ϵ -viniférine seule ou mélangée avec du resvératrol puis activées 24 heures au LPS ou au milieu de traitement N9.

3.7 L' ϵ -viniférine seule ou utilisée en combinaison avec le resvératrol protège les neurones PC12 de la cytotoxicité induite par des microglies N9 activées dans une co-culture microglie-neurone

Comme il a été démontré à la figure 3.5, l' ϵ -viniférine est capable de diminuer le potentiel inflammatoire de cellules microgliales lorsqu'introduit avant leur activation. Par la suite, il a été intéressant de tester le prétraitement des neurones PC12 directement plutôt que celui des microglies N9. Ainsi, des cellules N9 prétraitées avec du milieu de traitement N9 ont été activées 24 heures par du LPS. 3 heures avant de mettre les inserts contenant les microglies N9 en co-culture avec les neurones PC12, ces dernières ont été prétraitées avec du milieu de traitement PC12 ou avec de l' ϵ -viniférine ou un mélange ϵ -viniférine/resvératrol. Après 24 heures, le taux de mort cellulaire des neurones a été dosé avec le test LDH. La figure 3.7 montre que comparativement à des neurones PC12 prétraités avec du milieu de traitement PC12 qui sont en présence de microglies activées, le prétraitement des neurones PC12 avec l' ϵ -viniférine ou l' ϵ -viniférine/resvératrol suffit pour diminuer le taux de mort cellulaire de 28 % et 51 %, respectivement. Ces résultats montrent que l' ϵ -viniférine seule ou avec le resvératrol peut protéger les neurones PC12 de la mortalité cellulaire causée par la

neuroinflammation microgliale et qu'un prétraitement combiné protège presque deux fois mieux.

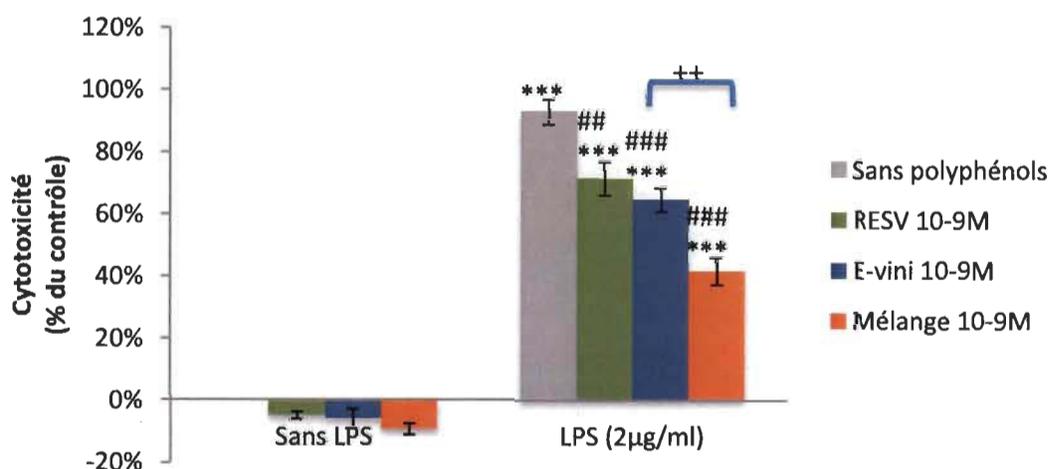


Figure 3.7 Dosage, par test LDH, de la mort cellulaire de neurones PC12 prétraitées 3 heures avec du milieu de traitement PC12 ou de l'ε-viniférine seule ou mélangée avec du resvératrol puis mises en co-culture avec des microglies N9 activées 24 heures au LPS ou du milieu de traitement N9. ### p<0,001, ## p<0,01 et # p<0,05 lorsque comparé à la condition «Sans polyphénols + LPS 2ug/ml» et *** p<0,001, ** p<0,01 et * p<0,05 lorsque comparé à la condition «Sans polyphénols + Sans LPS». +++ p<0,001, ++ p<0,01 et + p<0,05 lorsque comparé à la condition « E-vini + LPS 2ug/ml »

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Étant principalement d'étiologie inconnue, la MP affecte les neurones DAergiques de la SNpc ce qui diminue la quantité de la DA dans la voie nigro-striée, affectant le contrôle moteur. Pour tenter d'expliquer la perte des neurones DA caractéristiques de la MP, l'apoptose causée par le stress oxydatif ainsi que la neuroinflammation, sont les deux mécanismes cellulaires les plus étudiés. Pour étudier en détail le rôle du stress oxydatif et de la neuroinflammation dans le développement de la MP, la recherche actuelle utilise des neurotoxines à pouvoir oxydant comme la 6-OHDA et le MPP⁺ ainsi que des endotoxines pro-inflammatoires comme le LPS, qui permettent d'induire la mort des neurones DAergiques dans des modèles *in-vivo* et *in-vitro*. Pour contrecarrer l'effet néfaste de ces molécules, l'attention des chercheurs s'est tournée vers les polyphénols, des substances issues de plantes dont plusieurs possèdent la capacité d'attraper des électrons libres et ainsi agir comme molécules anti-oxydantes. Parmi ces polyphénols, le resvératrol est considéré comme l'un des plus prometteurs, ayant déjà démontré son effet neuroprotecteur dans des modèles *in-vitro* et *in-vivo* de la MP [168].

Dans la foulée de ces études, nous avons testé si l' ϵ -viniférine, un dimère de resvératrol qui possède plusieurs bienfaits communs avec le resvératrol, mais qui n'a pas été utilisé sur des neurones DAergiques, pouvait engendrer de la neuroprotection lorsque utilisé seul ou en combinaison avec le resvératrol. Cette neuroprotection de l' ϵ -viniférine a été déterminée par une évaluation de ses pouvoirs à contrecarrer la mort neuronale, l'apoptose et la neuroinflammation.

Concernant son potentiel neuroprotecteur, il a été démontré à la figure 3.1B et 3.1D qu'un prétraitement de trois heures au polyphénol ϵ -viniférine seul ou utilisé avec du resvératrol à une concentration de 10^{-9} M avant l'ajout de la neurotoxine 6-OHDA,

diminue la cytotoxicité de 20 % et promouvoit la survie cellulaire de 14 % comparativement à des neurones prétraités avec du milieu de traitement PC12 et traités à la 6-OHDA. Ces résultats suggèrent que l'ajout préventif du polyphénol pourrait d'activer les défenses antioxydantes de la cellule permettant sa survie lors de l'ajout de la toxine. Bien que l'on sache beaucoup de choses sur l'effet antioxydant du resvératrol, la littérature sur l' ϵ -viniférine dans ce domaine est restreinte. Cependant, les chercheurs expliquent les vertus antioxydantes de l' ϵ -viniférine grâce à son effet sur la protéine mitochondriale SIRT3. En effet, l' ϵ -viniférine parvient à augmenter l'activité de SIRT3 et affecte la cellule par deux voies de signalisation différentes [185]. Premièrement, une augmentation de la concentration de SIRT3 dans la cellule facilite sa capacité à activer la SOD, par déacétylation. Cette dernière permet de baisser le taux de ROS dans la cellule et plus particulièrement celui de l'ion O_2^{\bullet} [190,191]. Deuxièmement, une hausse de l'activité de SIRT3 favorise la biogénèse de la membrane mitochondriale par la phosphorylation de la protéine AMPK, un élément clé de l'homéostasie énergétique de la cellule. Par la suite AMPK, phosphoryle PGC-1 α qui permet la stimulation de l'activité de la chaîne de transport d'électron et l'activation de plusieurs enzymes antioxydants [192,193].

Ces explications peuvent s'appliquer à une utilisation individuelle de nos polyphénols à la concentration 10^{-9} M (Figures 3.1B et 3.2B), on n'observe pas de neuroprotection lorsque le resvératrol et l' ϵ -viniférine sont utilisés à des concentrations de 10^{-7} M (Figures 3.1A et 3.2A) et 10^{-12} M (Figures 3.1C et 3.2C). Cet effet particulier biphasique observé chez le resvératrol et l' ϵ -viniférine pourrait être expliqué par l'effet d'hormèse, concept qui a commencé à apparaître durant la deuxième moitié du 20^e siècle dans les ouvrages de toxicologie et de biologie médicale [194-197]. De plus cet effet a été rapporté dans de nombreuses études dans le domaine des maladies neurodégénératives comme la MP et la MA [198,199]. Ce principe explique que certaines molécules, dont celles extraites de plantes comme les polyphénols, ont un effet bénéfique à des doses faibles et un effet toxique (ou l'absence d'effet bénéfique) à des doses plus élevées [200]. Au niveau cellulaire, cet effet bénéfique se traduit par une adaptation de la cellule face à un stress [197,201]. Bien que l'effet d'hormèse soit peu

documenté pour l' ϵ -viniférine, le resvératrol qui lui ressemble structurellement possède plusieurs vertus antioxydantes causées par cet effet [202]. Par exemple, lorsqu'utilisé à des doses faibles, le resvératrol induit l'expression des enzymes antioxydantes Cat [203], glutathione S-transférase [203] et HO-1 (dans des cellules PC12) [161] pour permettre à la cellule de s'adapter à un stress.

Enfin, tel que montré par les résultats des figures 3.1 et 3.2, nous avons montré qu'un prétraitement combiné du resvératrol et de l' ϵ -viniférine engendrait un effet neuroprotecteur plus important comparé à l'utilisation des deux polyphénols individuellement, et ce, à une concentration de 10^{-7} M, 10^{-9} M et 10^{-12} M. En effet, on y observe respectivement une baisse de la mortalité cellulaire de 23 %, 28 % et 36 % comparativement à des neurones PC12 prétraités avec du milieu de traitement PC12 et traités avec la 6-OHDA ainsi qu'une augmentation de la survie cellulaire de 21 %, 26 % et 34 % respectivement. Cet effet additif des polyphénols sera traité à la fin de la discussion.

Concernant le potentiel anti-apoptotique, comme il a été expliqué dans l'introduction de ce mémoire, la toxine 6-OHDA inhibe le premier complexe de la chaîne de transport d'électron de la mitochondrie. De plus, la 6-OHDA peut s'autooxyder ou réagir avec la MAO-B pour donner de l' H_2O_2 et de l' $\bullet OH$ [73,74]. Cette hausse de la production de ROS permet de déséquilibrer le potentiel membranaire mitochondriale, facilitant la sortie du cytochrome c, un des inducteurs principaux des voies d'activation intrinsèques de l'apoptose qui clive la pro-Caspase-3 en Caspase-3 clivée, permettant de démanteler plusieurs éléments clés à la survie cellulaire. Un de ces éléments est la protéine nucléaire PARP-1 [204] qui est nécessaire à la réparation de l'ADN en cas de stress cellulaire, comme une accumulation anormale de ROS ou une fragmentation de l'ADN, par exemple. Nos résultats ont démontré que, comparativement à des neurones PC12 prétraités avec du milieu de traitement PC12 et traités à la 6-OHDA, les neurones PC12 prétraités à l' ϵ -viniférine (10^{-9} M) permet de baisser le taux de cellules apoptotiques de 26 %, tel que démontré à la figure 3.3. Dans le cas d'un prétraitement combiné ϵ -viniférine/resvératrol, on y observe une baisse de 37 % de la

mortalité cellulaire. De plus, dans les mêmes conditions, il y a diminution des ratios d'expression des protéines indicatrices de l'apoptose Caspase-3 clivée (Figure 3.4A) et PARP-1 clivée (Figure 3.4B). Dans le cas de la protéine Caspase-3 clivée, le ratio passe de 0,27 dans des cellules prétraitées avec du milieu de traitement PC12 et traitées avec la 6-OHDA à 0,21 dans des cellules ayant reçu un prétraitement ϵ -viniférine/resvératrol. Pour la protéine PARP-1 le ratio passe de 0,25 à 0,19. Cet effet anti-apoptotique est amplifié lors d'un prétraitement combiné avec les deux polyphénols, resvératrol et ϵ -viniférine, le ratio d'expression de Caspase-3 clivé passe de 0,27 (avec toxine mais sans polyphénols, que du milieu de traitement PC12) à 0,18 dans des cellules ayant la toxine et les polyphénols. Tandis que pour l'expression de PARP-1, le rapport passe de 0,25 à 0,15.

Tel que mentionné plus haut, l' ϵ -viniférine augmente la traduction de SIRT3 qui en autres, permet de maintenir la fonctionnalité de la chaîne de transport d'électron et l'intégrité de la membrane mitochondriale [205]. De plus, SIRT3 permet de maintenir les niveaux d'ATP de la cellule, un facteur important dans la modulation des mécanismes apoptotiques [206]. De plus, il a été expliqué dans l'introduction que le resvératrol permet l'activation de SIRT 1, ce dernier permet de déacétyler la protéine pro-apoptotique p53 dans des neurones ce qui permet son inactivation [164]. Est-ce que SIRT3, qui est apparenté à SIRT1, peut-il faire de même dans un modèle neuronal? Il n'y a pas encore de résultats dans la littérature qui puisse confirmer cette hypothèse. Cependant, des études dans cette direction pourront mieux nous faire comprendre les effets anti-apoptotiques de l' ϵ -viniférine.

Concernant le potentiel anti-inflammatoire, nos résultats démontrent qu'un prétraitement de trois heures à l' ϵ -viniférine seule ou avec du resvératrol (10^{-9} M) avant une activation des microglies N9 au LPS, permet de diminuer le potentiel inflammatoire de ces cellules, protégeant les neurones PC12 lorsque mis ensemble en co-culture (Figure 3.5). La neuroinflammation causée par la microglie a été grandement étudiée comme possible cause de la MP, pour plusieurs raisons. Premièrement, de toutes les régions du cerveau, c'est dans la SNpc que se trouve la plus grande concentration de

microglies [103], indiquant que cette zone est particulièrement sensible aux dommages cellulaires causés par la neuroinflammation. Deuxièmement, plusieurs études post-mortem sur des patients et des animaux parkinsoniens ont démontré aussi une activation localisée de la microglie dans la SNpc [107,108].

Concernant l' ϵ -viniférine, on sait peu de choses sur ses effets anti-inflammatoires sur le système nerveux et encore moins sur les neurones DAergiques. Par contre, il a été démontré qu'un prétraitement à l' ϵ -viniférine sur des cellules différenciées en adipocytes et dans un modèle de souris ayant eu une diète riche en graisses, baissait l'expression du gène de TNF- α ce qui permet de diminuer la production de cytokines et chimiokines [207]. Ensuite, il a été démontré dans ce mémoire que l' ϵ -viniférine seule ou avec le resvératrol peut protéger les neurones PC12 de la mortalité cellulaire causée par la neuroinflammation microgliale (Figure 3.7). En effet, comparativement à des neurones PC12 prétraités au milieu de traitement PC12, mais en présence de microglies activées, on y observe une baisse de la mortalité cellulaire de 28 % dans le cas d'un prétraitement avec ϵ -viniférine seule et de 51 % lorsque le prétraitement est combiné avec le resvératrol. Comme il a été expliqué précédemment dans cette discussion, l' ϵ -viniférine est un activateur indirect de la SOD qui permet de neutraliser l'ion O_2^{\bullet} [185]. Ce dernier peut induire l'activation de NF- κ B, surtout lorsqu'il y a stimulation par le TNF- α , une cytokine sécrétée par les macrophages et les microglies [101,208]. Tel qu'observé à la figure 3.6, un traitement des microglies N9 au LPS ne semble pas causer de l'apoptose dans un contexte de co-culture cellulaire. Les photos en immunofluorescence (Figure 3.6) sous-entendent cette interprétation. C'est qui est insolite vu que lors d'expériences de notre laboratoire par les années passées utilisant la co-culture microglie-neurone, la neuroinflammation a montré des images au niveau cellulaire d'apoptose [186,187]. Cette disparité dans mes résultats et ceux obtenus précédemment au laboratoire dans des expériences similaires pourrait peut-être indiquer que la mort cellulaire causée par la neuroinflammation en co-culture microglie-neurone pourrait induire l'expression des marqueurs typiques de l'apoptose sans toutefois en être. En effet, depuis quelques années, des études ont montré un type de mort cellulaire qui exprime les marqueurs de l'apoptose et de la nécrose, la nécroptose. Ces dernières années, des études ont démontré

que certains problèmes neurologiques pouvaient être causés par la nécroptose, comme des traumatismes de la moelle épinière qui touche les astrocytes et les microglies [209,210], la sclérose en plaques qui affecte les oligodendrocytes [211] et même la sclérose latérale amyotrophique qui détruit les neurones moteur de la moelle épinière [212]. Plusieurs stimuli peuvent activer ces voies necroptotiques et ils peuvent provenir autant de cellules inflammatoires que de la cellule neuronale même. Des molécules produites principalement par les microglies comme le TNF- α ou le ligand Fas ou même des dommages à l'ADN au sein de la cellule affectée peuvent initier ce mécanisme en agissant sur le récepteur de TNF- α (TNFR) [213-215]. La necroptose n'est pas encore totalement comprise, mais l'activation de TNFR provoquerait la formation d'un complexe surnommé le complexe 1, composé de protéines de mort cellulaire (TRADD, FADD), de la kinase RIPK1, de facteurs associés à TNFR (TRAF) et d'ubiquitines comme cIAP [216,217]. À ce stade-ci, si RIP1 n'est pas ubiquitiné par cIAP ou TRAF, il y aura activation de voies de survie cellulaire [218,219]. Cependant, s'il y a ubiquitination de RIP1, il se détache du complexe 1 et il se lie avec FADD, TRADD, RIP3 et la Caspase-8 pour former un nouveau complexe, le complexe 2 [220,221]. Si la Caspase-8 est activée, elle pourra cliver RIP1 et RIP3, activant des voies apoptotiques extracellulaires [222]. En contrepartie, si la Caspase-8 est inhibée ou absente, RIP1 et 3 resteront actives et iront former, avec la protéine MLKL, le necrosome qui activera des signaux causant la nécroptose [223].

Concernant l'utilisation de polyphénols en combinaison, nous avons observé qu'un prétraitement resvératrol/ ϵ -viniférine, aux trois concentrations utilisées donne un meilleur potentiel neuroprotecteur (Figures 3.1 et 3.2), anti-apoptotique (Figures 3.3 et 3.4) et anti-inflammatoire (Figures 3.5 et 3.7) comparativement à une utilisation des polyphénols seuls. Ce qui est intéressant et prometteur vu que le resvératrol seul est très facilement métabolisé dans le foie et l'intestin, ce qui limite sa biodisponibilité [143]. La littérature sur le resvératrol décrit maintes fois son effet synergétique avec d'autres polyphénols. Par exemple, le resvératrol et la quercertine sont utilisés ensemble pour réduire les taux d'agrégats β -amyloïde, présent dans plusieurs maladies neurodégénératives comme la MP [224]. De plus, le resvératrol est utilisé en

combinaison avec d'autres polyphénols dans des études cliniques sur le cancer [225], les problèmes vasculaires [226], l'obésité et l'ostéoporose [227]. Cette synergie entre polyphénols est encore peu comprise, mais certaines études émettent l'hypothèse que cet effet serait causé lorsqu'on induit plusieurs cibles ou voies de signalisation intracellulaires sous-jacentes dans l'évolution d'une maladie [228,229].

Mes résultats ont ouvert de nouvelles perspectives pour l'étude des polyphénols à de petites concentrations ainsi que lors d'une administration combinée dans des modèles *in-vivo* de maladies neurodégénératives.

The logo for Clicours.COM is displayed in white, bold, sans-serif capital letters on a solid blue rectangular background.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Mes travaux de recherche ont évalué le potentiel neuroprotecteur de l' ϵ -viniférine lorsqu'utilisée seule ou en combinaison avec son dimère structurel, le resvératrol, dans un modèle cellulaire de la MP. L' ϵ -viniférine seule à une concentration de 10^{-9} M est parvenue à protéger les neurones PC12 de la mort cellulaire et de l'apoptose induite par une toxine parkinsonienne, la 6-OHDA. Dans ce modèle, nous avons démontré son potentiel antioxydant et anti-apoptotique. De plus, cette neuroprotection est plus prononcée lorsque l' ϵ -viniférine est utilisée avec du resvératrol.

Par la suite, dans une co-culture microglie-neurone, l' ϵ -viniférine seule à une concentration de 10^{-9} M est parvenue à baisser le potentiel inflammatoire de microglies N9 activées au LPS ce qui a permis de protéger les neurones PC12 de la mort cellulaire par neuroinflammation. De plus, l' ϵ -viniférine a aussi réussi à protéger les neurones PC12 de l'inflammation causée par des microglies N9 non prétraitées aux polyphénols et activées au LPS. Ces observations démontrent le potentiel anti-inflammatoire de l' ϵ -viniférine. Également, cette protection est amplifiée lorsque ce polyphénol est utilisé avec du resvératrol.

Ce projet de recherche possède plusieurs perspectives futures. Premièrement, notre laboratoire voudrait vérifier le potentiel neuroprotecteur de l' ϵ -viniférine ou d'un mélange ϵ -viniférine/resvératrol dans un modèle *in-vivo*. Aussi, il serait intéressant d'observer l'effet de synergie de l' ϵ -viniférine avec d'autres polyphénols comme la quercertine, qui possède déjà une synergie avec le resvératrol. Pour renforcer nos résultats *in-vivo*, nous voudrions déterminer quelles cytokines sont sécrétées lors que l'activation microgliale au LPS. De plus, nous voudrions faire les expériences décrites dans ce mémoire, mais avec un modèle cellulaire différent. Prochainement, nous

voudrions utiliser une autre lignée neuronale dopaminergique, les cellules N27 qui sont des cellules mésencéphaliques embryonnaires de rat. Aussi, nous voudrions faire des immunobuvardages «Western» sur des neurones PC12 utilisés en co-culture avec des microglies N9 activées pour vérifier la présence ou l'absence de la caspase-8 qui serait déterminant dans l'activation de phénomènes apoptotiques ou nécroptotiques.

Ce projet a donc réussi à mettre en valeur le potentiel neuroprotecteur d'un polyphénol qui n'avait jamais été testé sur des neurones DAergiques, l' ϵ -viniférine. Ce qui permettrait peut-être de faire une percée dans l'élaboration de traitements de prévention dans la MP. Prouvant par le fait même qu'une solution à nos problèmes de santé qui menace notre population vieillissante est peut-être plus près qu'on ne le pense.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Manyam BV. Paralysis agitans and levodopa in “Ayur-veda”: Ancient Indian medical treatise. *Mov Disord* 1990; 5: 47-8.
2. Zhang Z-X, Dong Z-H, Romàn GC. Early descriptions of Parkinson’s disease in ancient China. *Arch Neurol* 2006; 63(5): 782-84.
3. Sylvius de la Boë F. *Opera Medica*. Danielelem Elsevirium et Abrahamum Wolfgang, Amsterdam. 1680.
4. Sauvages de la Croix FB. *Nosologia methodica Amstelodami: Sumptibus Fratrum de Tourmes*. 1763.
5. Parkinson J. An essay on the shaking paisy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2002; 14(2): 223-36.
6. Charcot J-M. De la paralysie agitante. *Gaz Hebdomadaire Med. Chir*. 1861 8: 765-67.
7. Hornykiewicz O. The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain: *J Neural Transm Suppl* 2006; 70: 9-15.
8. Von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, Botzel K, Sampaio C, Poewe W, Siebert U, Berger K, Dodel R. Prevalence and incidence of Parkinson’s disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol* 2005; 15(4): 473-90.
9. Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TD. The prevalence of Parkinson’s disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 2014; 29(13): 1583-90.
10. Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A, Tanner CM. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 2007; 68(5): 384-6.
11. Elbaz A, Tranchant C. Epidemiology studies of environmental exposures in Parkinson’s disease: *J Neurol Sei*, 2007; 262(1-2): 37-44.
12. Wooten GF, Currie LJ, Bovbjerg VE, Lee JK, Patrie J. Are men at greater risk for Parkinson’s disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75(4): 637-9.

13. Taylor KS, Cook JA, Counsell CE. Heterogeneity in male to female risk for Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78(8): 905-6.
14. Elbaz A, Carcaillon L, Kab S, Moisan F. Epidemiology of Parkinson's disease. *Revue neurologique* 2016; 172(1): 14-26.
15. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003; 39(6): 889-909.
16. Weintraub D, Comella CL, Horn S. Parkinson's disease--Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment. *Am J Manag Care* 2008; 14(2 Suppl): S40-8.
17. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79(4): 368-76.
18. Pollak P. La maladie de Parkinson. santé au quotidien, ed. O. Jacob. 2004, Paris. 191 pp.
19. Hughes AJ, Daniel SE, Lees AJ. The clinical features of Parkinson's disease in 100 histologically proven cases. *Adv Neurol*, 1993; 60: 595-99.
20. Rouhart FZaF., Maladie de Parkinson. 2e ed, ed. c. conduites. 2006: Doin. 218 pp.
21. Nutt JG, Hammerstad JP, Gancher ST, Parkinson's disease, 100 Maxims: 100 Maxims in Neurology 1992 St. Louis, 169 pp.
22. Aarsland D, Larsen JP, Lim NG, Janvin C, Karlsen K, Tandberg E, Cummings JL. Range of neuropsychiatric disturbances in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 67(4): 492-96.
23. Burn DJ. Beyond the iron mask; towards better recognition and treatment of depression associated with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2002; 17(3): 445-54.
24. Richard IH, Schiffer RB, Kurlan R. Anxiety and Parkinson's disease. *J Neuropsychatry Clin Neurosci* 1996; 8(4): 383-92.
25. Chaudhuri KR, Schapira AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *The Lancet Neurology*, 2009; 8(5): 464-74.
26. Emre M. Dementia in Parkinson's disease: cause and treatment. *Curr Opin Neurol*, 2004; 17(4): 399-404.

27. Dhawan V, Healy DG, Pal S, Chaudhuri KR. Sleep-related problems of Parkinson's disease. *Age Ageing* 2006; 35(3): 220-28.
28. Lieberman, A., Depression in Parkinson's disease -- a review. *Acta Neurol Scand.* 2006; 113(1): 1-8.
29. Uchiyama T, Sakakibara R, Hattori T, Yamanishi T. Short-term effect of a single levodopa dose on micturition disturbance in Parkinson's disease patients with the wearing-off phenomenon. *Mov Disord* 2003; 18(5): 573-78.
30. Pfeiffer RF. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 2003; 2(2): 107-16.
31. Bronner G, Royter V, Korczyn AD, Giladi N. Sexual dysfunction in Parkinson's disease. *J Sex Marital Ther.* 2004; 30(2): 95-105.
32. Muller A, Reichmann H, Livermore A, Hummel T. Olfactory function in idiopathic Parkinson's disease (IPD): results from cross-sectional studies in IPD patients and long-term follow-up of de-novo IPD patients. *J Neural Transm.* 2002; 109(5-6): 805-11.
33. Büttner T, Kuhn W, Müller T, Patzold T, Heidbrink K, Przuntek H. Distorted color discrimination in 'de novo' parkinsonian patients. *Neurology* 1995; 45(2): 386-87.
34. Le cerveau à tous les niveaux. Le circuit de la récompense. Repéré à http://lecerveau.mcgill.ca/flash/a/a_03/a_03_cl/a_03_cl_que/a_03_cl_que.html (2003).
35. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, Lamantia AS, Mc Namara JO. *Neurosciences*. Traduction de la 1^{ère} édition américaine, Belgique : De Boeck (1999) p.336
36. Marsden CD. Neuromelanin and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 1983; 19: 121-41.
37. Zecca L, Casella L, Albertini A, Bellei C, Zucca FA, Engelen M, Zadlo A, Szewczyk G, Zareba M, Sarna T. Neuromelanin can protect against iron-mediated oxidative damage in system modeling iron overload of brain aging and Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2008; 106(4): 1866-75.
38. Youdim MB, Riederer P. Understanding Parkinson's disease: *Sci Am.* 1997; 276(1): 52-9.

39. Lewy FH. Paralysis agitans. I. Pathologische Anatomie. Handbuch der Neurologie (ed. Lewandowsky, M.) 1912 Vol. 3, Springer, Berlin, pp. 920-58.
40. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95(11): 6469-73.
41. Danielson SR, Andersen JK. Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease: *Free Radical Biol Med*. 2008; 44(10): 1787-94.
42. Dickson DW, Feany MB, Yen SH, Mattiace LA, Davies P. Cytoskeletal pathology in non-Alzheimer degenerative dementia: new lesions in diffuse Lewy body disease, Pick's disease, and corticobasal degeneration. *Journal of Neural Transmission. Suppl.* 1996; 47: 31-46.
43. Uversky VN. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem*. 2007; 103(1): 17-37.
44. Gibb WR, Lees AJ. The significance of the Lewy body in the diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1989; 15(1): 27- 44.
45. Thomas B, Beai MF. Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 2007; 16(Spec No. 2): R183-94.
46. Bertram L, Tanzi RE. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest*. 2005; 115(6): 1449-57.
47. 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. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276(5321): 2045-47.
48. Krüger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Eppelen JT, Schöls L, Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Gen.* 1998; 18(2): 106-8.
49. Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atarés B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Muñoz DG, de Yébenes JG. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* 2004; 55(2): 164-73.

50. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muenter M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302(5646): 841.
51. Goldberg MS, Lansbury PT Jr.. Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nat Cell Biol.* 2000; 2(7): E115-9.
52. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism: *Nature* 1998; 392(6676): 605-8.
53. Henn IH, Bouman L, Schlehe JS, Schlierf A, Schramm JE, Wegener E, Nakaso K, Culmsee C, Berninger B, Krappmann D, Tatzelt J, Winklhofer KF. Parkin mediates neuroprotection through activation of IkappaB kinase/nuclear factor-kappaB signaling. *J Neurosci.* 2007; 27(8): 1868-78.
54. Sasaki S, Shirata A, Yamane K, Iwata M. Parkin-positive autosomal recessive juvenile Parkinsonism with alpha-synuclein-positive inclusions *Neurology.* 2004; 63(4): 678-82.
55. Tan EK, Skipper LM. Pathogenic mutations in Parkinson disease. *Human mutation* 2007; 28(7): 641-53.
56. Yang Y, Gehrke S, Imai Y, Huang Z, Ouyang Y, Wang JW, Yang L, Beal MF, Vogel H, Lu B. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin: *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(28): 10793-8.
57. Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Arigo SM, Takahashi K, Arigo H. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO reports* 2004; 5(2): 213-18.
58. Martinat C, Shendelmann S, Jonason A, Leete T, Beal MF, Yang L, Floss T, Abeliovich A. Sensitivity to oxidative stress in DJ-1-deficient dopamine neurons: an ES- derived cell model of primary Parkinsonism. *PLoS Biol* 2004; 2(11): e327.
59. Vila M, Przedborski S. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat Med.* 2004; 10(Suppl): S58-S62.
60. Gutteridge JM, Halliwell B. Oxidative stress, brain iron and neurodegeneration. *Basic principles* 1996 pp. 1-21 Academic Press: London.

61. Sies H. Oxydative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997; 82(2): 291-5.
62. Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci.* 2002; 3(12): 932-42.
63. Fukae J, Mizuno Y, Hattori N. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: Mitochondrion 2007; 7: 58-62.
64. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of neurology* 2003; 53(S3): S26-S38.
65. Fiskum G, Starkov A, Polster BM, Chinopoulos C. Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 991(1): 111-9.
66. Moreira PI, Siedlak SL, Aliev G, Zhu X, Cash AD, Smith MA, Perry G. Oxidative stress mechanisms and potential therapeutics in Alzheimer disease. *J Neural Transm* 2005; 112(7): 921-32.
67. Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B.* 2005; 827(1): 65-75.
68. Cohen, G. Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology* 1983; 5(1): 77-82.
69. Oakley AE, Collingwood JF, Dobson J, Love G, Perrott HR, Edwardson JA, Eistner M, Morris CM. Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease: *Neurology*, 2007; 68(21): 1820-5.
70. Ahlskog JE. Challenging conventional wisdom: the etiologic role of dopamine oxidative stress in Parkinson's disease. *Movement Disord.* 2005; 20(3): 271-82.
71. Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Alzheimer's and Parkinson's diseases and coenzyme Q10 as a potential treatment. *J Bioenerg Biomembr.* 2004; 36(4): 381-86.
72. Sulzer D, Zecca L. Intra-neuronal dopamine-quinone synthesis: a review. *Neurotox Res.* 2000; 1(3): 181-95.
73. Breese GR, Traylor TD. Depletion of brain noradrenaline and dopamine by 6-hydroxydopamine. *British Journal of Pharmacology* 1971; 42(1): 88-99.

74. Saner A, Thoenen H. Model experiments on the molecular mechanism of action of 6- hydroxydopamine. *Mol. Pharmacol.* 1971; 7(2): 147-54.
75. Zecca L, Casella L, Albertini A, Bellei C, Zucca FA, Engelen M, Zadlo A, Szewczyk G, Zareba M, and Sarna T. Neuromelanin can protect against iron-mediated oxidative damage in system modeling iron overload of brain aging and Parkinson's disease: *J Neurochem.* 2008; 106(4): 1866-75.
76. Ambani LM, Van Woert MH, Murphy S. Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease: *Arch Neurol.* 1975; 32(2): 114-18.
77. Maier CM, Chan PH. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *The Neuroscientist* 2002; 8(4): 323-34.
78. Shirai Y. On the transplantation of the rat sarcoma in adult heterogenous animals. *Jap Med World* 1921; 1: 14-5.
79. Matyszak MK, Perry VH. Demyelination in the central nervous system following a delayed-type hypersensitivity response to bacillus Calmette-Guerin. *Neuroscience*, 1995; 64(4): 967-77.
80. Stevenson PG, Hawke S, Sloan DJ, Bangham CR. The immunogenicity of intracerebral virus infection depends on anatomical site. *J Virol.* 1997; 71(1): 145-51.
81. Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* 2007; 28(1): 12-8.
82. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1788(4): 842-57.
83. Desai BS, Monahan AJ, Carvey PM, Hendey B. Blood-brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: implications for drug therapy. *Cell Transplant* 2007; 16(3): 285-99.
84. Blood-brain barrier – RIT : College of imaging Arts and Sciences. Repéré à <https://cias.rit.edu/faculty-staff/101/faculty/340> (2015).
85. Pfrieger FW, Barres BA. Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* 1997; 277(5332): 1684-7.

86. Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 2007; 28(3): 138-45.
87. Lin LFH, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993; 260(5111): 1130.
88. Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squinto SP, Lindsay RM. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 1991; 350(6315): 230-2.
89. Cuadros MA, Navascues J. The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol.* 1998; 56(2): 173-89.
90. Giulian D, Li J, Bartel S, Broker J, Li X, Kirkpatrick JB. Cell surface morphology identifies microglia as a distinct class of mononuclear phagocyte. *J Neurosci.* 1995; 15(11): 7712-26.
91. Wood PL. *Neuroinflammation: mechanisms and management.* 2nd ed. Contemporary neuroscience. 2003, Totowa, NJ.: Humana Press. 419 p.
92. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 2005; 308(5726): 1314-8.
93. Kim YS, Joh TH. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Mol Med.* 2006; 38(4): 333-47.
94. Phillips LM, Simon PJ, Lampson LA. Site-specific immune regulation in the brain: differential modulation of major histocompatibility complex (MHC) proteins in brainstem vs. hippocampus. *J Comp Neurol.* 1999. 405(3): 322-33.
95. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 2005; 8(6): 752-8.
96. Langston JW, Forn LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine exposure. *Annals of neurology.* 1999; 46(4): 598-605.
97. Castano A, Herrera AJ, Cano J, Machado A. Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *Journal of neurochemistry* 1998; 70(4): 1584-92.

98. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 1996; 19(8): 312-8.
99. Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debré P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC. FcεRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-α in glial cells. *J Neurosci.* 1999; 19(9): 3440-47.
100. Baeuerle PA. Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF-κB puzzle? *Curr Bio.* 1998; 8(1): R19-R22.
101. Teismann P, Tieu K, Cohen O, Choi DK, Wu DC, Marks D, Vila M, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2003; 18(2): 121-29.
102. McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 1988; 38(8): 1285-1285.
103. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1990; 39(1): 151-70.
104. Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T. Tumor necrosis factor-α (TNF-α) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett.* 1994; 165(1): 208-10.
105. Godbout JP, Chen J, Abraham J, Richwine AF, Berg BM, Kelley KW, Johnson RW. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. *The FASEB Journal* 2005; 19(10): 1329-31.
106. Chen H, Zhang SM, Hernán MA, Schwarzschild MA, Willett WC, Colditz GA, Speizer FE, Ascherio A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2003; 60(8): 1059-64.
107. Ouchi Y, Yagi S, Yokokura M, Sakamoto M. Neuroinflammation in the living brain of Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 2009; 15: S200-S204.
108. Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *The Lancet Neurology* 2009; 8(4): 382-397.

109. Hala K, Vilhelmova M, Hartmanova I, Pink W. Chronic parkinsonism in humans due to product of meperidine-analog synthesis. 1983
110. Bove J, Prou O, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx*. 2005; 2(3): 484-94.
111. Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res*. 2004; 318(1): 215-24.
112. He XJ, Nakayama H. Neurogenesis in Neurotoxin-induced Animal Models for Parkinson's Disease-A Review of the Current Status. *Journal of toxicologic pathology* 2009; 22(2): 101-8.
113. Andrew R, Watson DG, Best SA, Midgley JM, Wenlong H, Petty RK. The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls: *Neurochem Res*. 1993; 18(11): 1175-7.
114. Jonsson G. Chemical neurotoxins as denervation tools in neurobiology: *Annu Rev Neurosci*. 1980; 3(1): 169-87.
115. Saito Y, Nishio K, Ogawa Y, Kinumi T, Yoshida Y, Masuo Y, Niki E. Molecular mechanisms of 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity in PC12 cells: involvement of hydrogen peroxide-dependent and independent action. *Free Radic Biol Med*. 2007; 42(5): 675-85.
116. Choi W S, Yoon SY, Oh TH, Choi EJ, O'Malley KL, Oh YJ. Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine- and MPP+- induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK. *J Neurosci Res*. 1999; 57(1): 86-94.
117. Perumal AS, Gopal VB, Tordzro WK, Cooper TB, Cadet JL. Vitamin E attenuates the toxic effects of 6-hydroxydopamine on free radical scavenging systems in rat brain. *Brain Res Bull*. 1992; 29(5): 699-701
118. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou MF, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, 2001; 65(2), 135-72.
119. Finlay BB, Hancock RE. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2(6): 497-504.

120. Bournival J, Quessy P, Martinoli, MG. Protective effects of resveratrol and quercetin against MPP⁺-induced oxidative stress act by modulating markers of apoptotic death in dopaminergic neurons. *Cellular and molecular neurobiology*, 2009; 29(8), 1169-80.
121. Renaud J, Martinoli MG. Resveratrol as a protective molecule for neuroinflammation: a review of mechanisms. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2014; 15(4), 318-29.
122. Bournival J, Plouffe M, Renaud J, Provencher C, Martinoli MG. Quercetin and Sesamin Protect Dopaminergic Cells from MPP⁺ sup. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2012.
123. Dutta G, Zhang P, Liu B. The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. *Fundam Clin Pharmacol*. 2008; 22(5): 453-64.
124. da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem*. 2001; 276(24): 21129-35.
125. Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med*. 1994; 179(1): 269-77.
126. Takeda K, Akira S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells*. 2001; 6(9): 733-42.
127. Bronstein DM, Perez-Otano I, Sun V, Sawin SM, Chan J, Wu GC, Hudson PM, Kong LY, Hong JS, McMillian MK. Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures. *Brain research*. 1995;704(1):112-6.
128. Gao HM, Jiang J, Wilson B, Zhang W, Hong JS, Liu B. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*. 2002;81(6): 1285-97.
129. Kim WG, Mohny RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong, JS. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *The Journal of neuroscience*. 2000;20(16):6309-16.

130. Sawada M, Kondo N, Suzumura A, Marunouchi T. Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain research*, 1989;491(2):394-7
131. Zielasek J, Tausch M, Toyka KV, Hartung HP. Production of nitrite by neonatal rat microglial cells/brain macrophages. *Cellular immunology*, 1992;141(1):111-20.
132. Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *The Journal of Immunology*, 1993;150(7):2659-67.
133. Renaud J, Martinoli MG. Development of an Insert Co-culture System of Two Cellular Types in the Absence of Cell-Cell Contact. *Journal of Visualized Experiments*. 2016;113:e54356-e54356.
134. Nutt JG. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of levodopa: *Mov Disord*. 2008; 23(S3), S580-S584.
135. Fahn S. The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease: *Mov Disord*. 2008; 23(S3): S497-S508.
136. Dujardin K, Defebvre L. Neuropsychologie de la maladie de Parkinson et des syndromes apparentés. *NPG Neurologie-Psychiatrie-Gériatrie*. 2007; 7(40): 49.
137. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 79(5): 727-47.
138. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: a molecule whose time has come? and gone? *Clin Biochem*. 1997; 30(2): 91-113.
139. Renaud SD, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet* 1992; 339(8808): 1523-6.
140. World Health Organization. Atlas of global epidemic of heart disease and stroke," in Part Three: The Burden. Deaths from Coronary Heart Disease. 2009.
141. Wu JM, Hsieh TC, Wang Z. Cardioprotection by resveratrol: A review of effects/targets in cultured cells and animal tissues. *Am. J. Cardiovasc. Dis.* 2011; 1(1): 38-47.

142. Tomé-Carneiro J, González M, Larrosa M, Yáñez-Gascón MJ, García-Almagro FJ, Ruiz-Ros JA, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA, Espín JC. One-year consumption of a grape nutraceutical containing resveratrol improves the inflammatory and fibrinolytic status of patients in primary prevention of cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* 2012; 110(3): 356-63.
143. Walle T. Bioavailability of resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2011; 1215(1): 9-15.
144. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug metabolism and disposition*, 2004;32(12):1377-82.
145. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 1991;175(3):880-5.
146. Du Q, Hu B, An HM, Shen KP, Xu L, Deng S, Wei MM. Synergistic anticancer effects of curcumin and resveratrol in Hepa1-6 hepatocellular carcinoma cells. *Oncology reports*, 2013;29(5):1851-58.
147. Miksits M, Wlcek K, Svoboda M, Kunert O, Haslinger E, Thalhammer T, Jäger W. Antitumor activity of resveratrol and its sulfated metabolites against human breast cancer cells. *Planta medica*, 2009;75(11):1227-30.
148. Maier-Salamon A, Böhmendorfer M, Riha J, Thalhammer T, Szekeres T, Jaeger W. Interplay between metabolism and transport of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2013;1290(1):98-106.
149. Andreadi C, Britton RG, Patel KR, Brown K. Resveratrol-sulfates provide an intracellular reservoir for generation of parent resveratrol, which induces autophagy in cancer cells. *Autophagy*, 2014;10(3):524-5.
150. Gelinas S, Martinoli MG. Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP+-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells. *J Neurosci Res.* 2002; 70(1): 90-6.
151. Singer CA, Rogers KL, Dorsa DM. Modulation of Bcl-2 expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons. *Neuroreport.* 1998; 9(11): 2565-8.

152. 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*. 2005; 138(3): 869-78.
153. Purdie DW. Consequences of long-term hormone replacement therapy. *Br Med Bull*. 2000; 56(3): 809-23.
154. Collins JA, Blake JM, Crosignani PG. Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment. *Hum Reprod Update*. 2005; 11(6): 545-60.
155. Basly JP, Marre-Fournier F, Le Bail JC, Habrioux G, Chulia AJ. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)- resveratrol: *Life Sci*. 2000; 66(9): 769-77.
156. Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, Klinge CM. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta 1. *Endocrinology* 2000; 141(10): 3657-67.
157. Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, Shi X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2003; 309(4): 1017-26.
158. Amorati R, Lucarini M, Mugnaini V, Pedulli GF. Antioxidant activity of o-bisphenols: the role of intramolecular hydrogen bonding: *J Org Chem*. 2003; 68(13): 5198-204.
159. de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications: *Biochem Soc Trans*. 2007; 35(5): 1156-60.
160. Aquilano K, Baldelli S, Rotilio G, Ciriolo MR. Role of nitric oxide synthases in Parkinson's disease: a review on the antioxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols. *Neurochemical research* 2008; 33(12): 2416-2426.
161. Chen CY, Jang JH, Li MH, Surh YJ. Resvéeratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 331(4): 993-1000.
162. Zhuang H, Kim YS, Koehler RC, Dore S. Potential mechanism by which resveratrol, a red wine constituent, protects neurons. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 993(1): 276-286.

163. Renaud J, Bournival J, Zottig X, Martinoli MG. Resveratrol protects DAergic PC12 cells from high glucose-induced oxidative stress and apoptosis: Effect on p53 and GRP75 localization. *Neurotox. Res.* 2014; 25(1): 110-23.
164. Ye J, Liu Z, Wei J, Lu L, Huang Y, Luo L, Xie H. Protective effect of SIRT1 on toxicity of microglial-derived factors induced by LPS to PC12 cells via the p53-caspase-3-dependent apoptotic pathway. *Neuroscience letters.* 2013; 553: 72-7.
165. Ignatowicz E, Baer-Dubowska W. Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases. *Pol J Pharmacol.* 2001; 53(6): 557-69.
166. Bi XL, Yang JY, Dong YX, Ming Wang JM, Cui YH, Ikeshima T, Zhao YQ, Wu CF. Resveratrol inhibits nitric oxide and TNF-alpha production by lipopolysaccharide-activated microglia. *Int Immunopharmacol.* 2005; 5(1): 185-93.
167. Capiralla H, Vingtdoux V, Zhao H, Sankowski R, Al-Abed Y, Davies P, Marambaud P. Resveratrol mitigates lipopolysaccharide and A β -mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF- κ B/STAT signaling cascade. *J. Neurochem.* 2012; 120(3): 461-72.
168. Renaud J, Martinoli MG. Resveratrol as a protective molecule for neuroinflammation: a review of mechanisms. *Current pharmaceutical biotechnology.* 2014; 15(4): 318-29.
169. Miki H, Uehara N, Kimura A, Sasaki T, Yuri T, Yoshizawa K, Tsubura A. Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells. *International journal of oncology,* 2012; 40(4): 1020-28.
170. Hsieh TC, Wu JM. Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Exp Cell Res.* 1999; 249(1): 109-15.
171. Szende B, Tyihak E, Kiraly-Veghely Z. Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. *Exp Mol Med.* 2000; 32(2): 88-92.
172. Clément MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, Penraiz S. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood.* 1998; 92(3): 996-1002.

173. Huang C, Ma WY, Goranson A, Dong Z. Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Carcinogenesis*. 1999; 20(2): 237-42.
174. Privat C, Telo JP, Bernardes-Genisson V, Vieira A, Souchard JP, Nepveu F. Antioxidant properties of trans- ϵ -viniferin as compared to stilbene derivatives in aqueous and nonaqueous media. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002; 50(5): 1213-7.
175. Langcake P, Pryce RJ. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*, 1977; 33(2): 151-2.
176. Zghonda N, Yoshida S, Ezaki S, Otake Y, Murakami C, Mliki A, Ghorbel A, Miyazaki H. ϵ -viniferin is more effective than its monomer resveratrol in improving the functions of vascular endothelial cells and the heart. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2012; 76(5): 954-960.
177. Murohara T, Witzendichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo DW, Isner JM. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1999; 19(5): 1156-61.
178. Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertension Research*. 2011; 34(1): 5-14.
179. Chauhan D, Pandey P, Hideshima T, Treon S, Raje N, Davies FE, Shima Y, Tai YT, Rosen S, Avraham S, Kharbanda S, Anderson KC. SHP2 mediates the protective effect of interleukin-6 against dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(36): 27845-50.
180. Barjot C, Tournaire M, Castagnino C, Vigor C, Vercauteren J, Rossi JF. Evaluation of antitumor effects of two vine stalk oligomers of resveratrol on a panel of lymphoid and myeloid cell lines: comparison with resveratrol. *Life sciences* 2007; 81(23): 1565-74.
181. Mochel F, Haller RG. Energy deficit in Huntington disease: why it matters. *J. Clin. Invest.* 2011; 121(2): 493-9.
182. Stack EC, Matson WR, Ferrante RJ. Evidence of oxidant damage in Huntington disease: translational strategies using antioxidants. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008; 1147: 79-92.

183. Gibson GE, Starkov A, Blass JP, Ratan RR, Beal MF. Cause and consequence: mitochondrial dysfunction initiates and propagates neuronal dysfunction, neuronal death, and behavioral abnormalities in age-associated neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010; 1802(1): 122-134.
184. Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, Bunkenborg J, Streeper RS, Mostoslavsky R, Kim J, Yancopoulos G, Valenzuela D, Murphy A, Yang Y, Chen Y, Hirschey MD, Bronson RT, Haigis M, Guarente LP, Farese Jr RV, Weissman S, Verdin E, Schwer B. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol. Cell. Biol.* 2007; 27(24): 8807-14.
185. Fu J, Jin J, Cichewicz RH, Hageman SA, Ellis TK, Xiang L, Peng Q, Jiang M, Arbez N, Hotalling K, Ross CA, Duan W. trans-(ϵ)-viniferin increases mitochondrial sirtuin 3 (SIRT3), activates AMP-activated protein kinase (AMPK), and protects cells in models of Huntington Disease. *Journal of Biological Chemistry*, 2012; 287(29): 24460-24472.
186. Bournival J, Plouffe M, Renaud J, Provencher C, Martinoli MG. Quercetin and Sesamin Protect Dopaminergic Cells from MPP⁺ sup. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2012.
187. Bureau G, Longpré F, Martinoli MG. Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. *Journal of neuroscience research*. 2008; 86(2): 403-10.
188. Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantification of lactate dehydrogenase in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J. Immunol Methods*. 1988; 115(1): 61-9.
189. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* 1989; 119: 203-10.
190. Shi T, Wang F, Stieren E, Tong Q. SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(14): 13560-67.
191. Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Gubern M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S, Ricquier D. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat. Genet.* 2000; 26(4): 435-9.

192. Schwer B, Bunkenborg J, Verdin RO, Andersen JS, Verdin E. Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; 103(27): 10224-9.
193. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM. (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 2006; 127(2): 397-408.
194. Eaton D, Klaassen CD. Principles of toxicology. In: Casarett & Doull's Essentials of Toxicology, Chapter 2. The McGraw-Hill Companies, Inc. pp. 6-20.
195. Calabrese V, Butterfield DA, Stella AM. Aging and oxidative stress response in the CNS. In: Lajtha A, Perez-Polo JR, Rossner S, editors. *Development and Aging Changes in the Nervous System. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. 3rd ed. 2008. p. 128-234.
196. Calabrese EJ, Dhawan G, Kapoor R, Iavicoli I, Calabrese V. What is hormesis and its relevance to healthy aging and longevity? *Biogerontology*. 2015; 16(6): 693-707.
197. Calabrese EJ. Evidence that hormesis represents an "overcompensation" response to a disruption in homeostasis. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1999; 42(2): 135-7.
198. Calabrese EJ. Enhancing and regulating neurite outgrowth. *Crit Rev Toxicol.* 2008; 38(4): 391-418.
199. Calabrese EJ. Astrocytes: adaptive responses to low doses of neurotoxins. *Crit Rev Toxicol.* 2008; 38(5): 463-71.
200. Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, Bolger PM, Borak J, Cai L, Cedergreen N, Cherian MG, Chiueh CC, Clarkson TW, Cook RR, Diamond DM, Doolittle DJ, Dorato MA, Duke SO, Feinendegen L, Gardner DE, Hart RW, Hastings KL, Hayes AW, Hoffmann GR, Ives JA, Jaworowski Z, Johnson TE, Jonas WB, Kaminski NE, Keller JG, Klaunig JE, Knudsen TB, Kozumbo WJ, Lettieri T, Liu SZ, Maisseu A, Maynard KI, Masoro EJ, McClellan RO, Mehendale HM, Mothersill C, Newlin DB, Nigg HN, Oehme FW, Phalen RF, Philbert MA, Rattan SI, Riviere JE, Rodricks J, Sapolsky RM, Scott BR, Seymour C, Sinclair DA, Smith-Sonneborn J, Snow ET, Spear L, Stevenson DE, Thomas Y, Tubiana M, Williams GM, Mattson MP. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007; 222(1): 122-8.

201. Calabrese EJ, Baldwin LA. Chemical hormesis: Its historical foundations as a biological hypothesis. *Hum Exper Toxicol.* 2000; 19(1):2-31.
202. Mattson MP, Cheng A. Neurohormetic phytochemicals: low-dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses. *Trends in neurosciences* 2006; 29(11): 632-9.
203. Li Y, Cao Z, Zhu H. Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacol. Res.* 2006; 53(1): 6-15.
204. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 1993; 53(17): 3976-85.
205. Ahn BH, Kim HS, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A, Deng CX, Finkel T. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; 105(36): 14447-52.
206. Verdin E, Hirschey MD, Finley LW, Haigis MC. Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. *Trends Biochem. Sci.* 2010; 35(12): 669-75.
207. Ohara K, Kusano K, Kitao S, Yanai T, Takata R, Kanauchi O. ϵ -Viniferin, a resveratrol dimer, prevents diet-induced obesity in mice. *Biochemical and biophysical research communications.* 2015; 468(4), 877-82.
208. Wang S, Leonard SS, Castranova V, Vallyathan V, Shi X. The role of superoxide radical in TNF-alpha induced NF-kappaB activation. *Annals of Clinical & Laboratory Science,* 1999; 29(3): 192-9.
209. Fan H, Zhang K, Shan L, Kuang F, Chen K, Zhu K, Ma H, Ju G, Wang YZ. Reactive astrocytes undergo M1 microglia/macrophages- induced necroptosis in spinal cord injury. *Mol Neurodegener* 2016;11(1):14.
210. Fan H, Tang HB, Kang J, Shan L, Song H, Zhu K, Wang J, Ju G, Wang YZ. Involvement of endoplasmic reticulum stress in the necroptosis of microglia/macrophages after spinal cord injury. *Neuroscience* 2015;311:362-73.
211. Ofengeim D, Ito Y, Najafov A, Zhang Y, Shan B, DeWitt JP, Ye J, Zhang X, Chang A, Vakifahmetoglu-Norberg H, Geng J, Py B, Zhou W, Amin P, Berlink Lima J, Qi C, Yu Q, Trapp B, Yuan J. Activation of necroptosis in multiple sclerosis. *Cell Rep* 2015;10(11):1836-49.

212. Re DB, Le Verche V, Yu C, Amoroso MW, Politi KA, Phani S, Ikiz B, Hoffmann L, Koolen M, Nagata T, Papadimitriou D, Nagy P, Mitsumoto H, Kariya S, Wichterle H, Henderson CE, Przedborski S. Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. *Neuron* 2014;81(5):1001-8.
213. Tait SW, Ichim G, Green DR. Die another way—non-apoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci.* 2014; 127(10): 2135-44.
214. Pan YH, Liu XY, Liu JQ, Liu Q, Yang Y, Yang JL, Zhang XF, Wu Y, Wang YZ. Necroptosis: a new link between cell death and inflammation. 2016; 3(1): 156-60.
215. Tenev T, Bianchi K, Darding M, Broemer M, Langlais C, Wallberg F, Zachariou A, Lopez J, MacFarlane M, Cain K, Meier P. et al. The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Molecular Cell* 2011; 43(3): 432-48.
216. Welz PS, Wullaert A, Vlantis K, Kondylis V, Fernandez-Majada V, Ermolaeva M, Kirsch P, Sterner-Kock A, van Loo G, Pasparakis M. FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation. *Nature* 2011; 477(7364): 330-4.
217. Han, J, Zhong CQ, Zhang DW. Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nat Immunol.* 2011; 12(12): 1143-9.
218. Newton K, Sun X, Dixit VM. Kinase RIP3 is dispensable for normal NF-kappa Bs, signaling by the B-cell and T-cell receptors, tumor necrosis factor receptor 1, and Toll-like receptors 2 and 4. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(4): 1464-9.
219. Oberst A, Dillon CP, Weinlich R, McCormick LL, Fitzgerald P, Pop C, Hakem R, Salvesen GS, Green DR. Catalytic activity of the caspase-8-FLIP (L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature* 2011; 471(7338): 363-7.
220. Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FK. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 2009; 137(6): 1112-23.
221. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(2): 135-47.

222. Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr Mol Med.* 2014; 8(3): 207-20.
223. Xie T, Peng W, Yan C, Wu J, Gong X, Shi Y. Structural insights into RIP3-mediated necroptotic signaling. *Cell Rep.* 2013;5(1):70-8.
224. Cazova Z, Siposova K, Kurin E, Mučaji, Nagy M. Amyloid aggregation of lysozyme: The synergy study of red wine polyphenols. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 2013; 81(6): 994-1004.
225. Zamin LL, Fillipi-Chiela EC, Dillenburg-Pilla P, Horn F, Salbego C, Lenz G. Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. *Cancer Science* 2009; 100(9): 1655-62.
226. Khandelwal AR, Hebert VY, Kleinedler JJ, Rogers LK, Ullevig SL, Asmis R, Shi R, Dugas TR. Resveratrol and Quercetin Interact to Inhibit Neointimal Hyperplasia in Mice with a Carotid Injury. *The journal of nutrition* 2012; 142(8): 1487-94.
227. Rayalam S, Della-Fera MA, Baile CA. Synergism between resveratrol and other phytochemicals: Implications for obesity and osteoporosis. *Molecular nutrition and food research.* 2011; 55(8): 1177-1185.
228. Mertens-Talcott SU, Percival SS. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Letters* 2005; 218(2): 141-151.
229. Reznichenko L, Kalfon L, Amit T, Youdim MBH, Mandel SA. Low Dosage of Rasagiline and Epigallocatechin Gallate Synergistically Restored the Nigrostriatal Axis in MPTP-Induced Parkinsonism. *Neurodegenerative Diseases* 2010; 7(4): 219-231.