

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ	III
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	VII
CHAPITRE I.....	1
INTRODUCTION	1
1.1 La maladie de Parkinson	2
1.1.1 Diagnostic.....	4
1.1.2 Épidémiologie.....	7
1.1.3 Pathogénèse	8
1.1.3.1 Les corps de Lewy.....	8
1.1.3.2 Le stress oxydant.....	9
1.1.4 Étiologie	10
1.1.5 Traitements.....	12
1.1.6 Neuroinflammation.....	14
1.1.7 Prévention.....	16
1.2 Le triterpénoïde Cucurbitacine E	17
1.2.1 Origine.....	17
1.2.2 Structure et mécanismes cellulaires.....	18
1.3 L'autophagie cellulaire.....	20
1.3.1 Dégradation cellulaire et types d'autophagie	21
1.3.2 Mécanismes de l'autophagie	24
1.3.3 Autophagie et neuroprotection	25
1.4 Hypothèses et objectifs.....	31
CHAPITRE II	32
LA CUCURBITACINE E POSSÈDE DES PROPRIÉTÉS NEUROPROTECTRICES ET UNE ACTIVITÉ MODULATRICE DE L'AUTOPHAGIE SUR LES NEURONES DOPAMINERGIQUES.....	32
2.1 Contribution des auteurs.....	32

2.2	Résumé de l'article.....	32
2.3	Cucurbitacin E has neuroprotective properties and autophagic modulating activities on dopaminergic neurons.....	33
	Abstract.....	34
	Introduction.....	34
	Materials and Methods.....	36
	Drugs and Chemicals.....	36
	Cucurbitacin E extraction and purification	36
	Cell culture and treatments.....	37
	Cytotoxicity measurements	37
	Specific apoptotic DNA denaturation detection.....	38
	ROS detection.....	38
	Immunofluorescence	39
	Analysis of autophagosomes.....	40
	Electrophoresis and immunoblot analysis.....	41
	Statistical analysis	41
	Results.....	42
	CuE treatment reduces MPP ⁺ -induced cell death.....	42
	CuE does not significantly lower oxidative stress.....	42
	CuE regulates the presence of autophagic vacuoles.....	43
	CuE reverts abnormal relocation of lysosomes induced by MPP ⁺ treatment.	44
	CuE does not visibly alter the neuronal cytoskeleton	45
	Discussion.....	46
	Acknowledgements.....	48
	References.....	49
	Legends to the figures.....	56
	CHAPITRE III.....	71
	RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES.....	71
	CHAPITRE IV.....	74
	CONCLUSION	74
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	84

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
Figure 1.1	Substance noire d'un patient parkinsonien (à gauche) et d'un patient sain. La perte de la couleur brune caractéristique de la SNpc est signe d'une déplétion en neurones dopaminergiques (tiré de CNS Pathology).....	4
Figure 1.2	Résumé de l'identification, du diagnostic et du pronostic de la maladie de Parkinson (tiré des Lignes directrices canadiennes sur la maladie de Parkinson (Société de Parkinson Canada 2012))......	6
Figure 1.3	Corps de Lewy sur une coupe histologique du cerveau (tiré de Emedicine.com, 2009)	9
Figure 1.4	Traitements de la MP précoce (tiré des Lignes directrices canadiennes sur la maladie de Parkinson (Société de Parkinson Canada 2012)).	14
Figure 1.5	La Cucurbitacée <i>Ecballium elaterium</i> (tiré de Viso Flora).....	17
Figure 1.6	Structure moléculaire de la Cucurbitacine E (tiré de l'Institut national du cancer des États-Unis).....	18
Figure 1.7	Différents types d'autophagie et les protéines impliquées dans la maladie de Parkinson. (Banerjee et al. 2010).....	23
Figure 1.8	Importance et rôle de la protéine p62 dans l'autophagie sélective. (Mizushima and Komatsu 2011).....	25
Figure 1.9	Rôle de la protéine HDAC6. (Kawaguchi, Kovacs et al. 2003)	26
Figure 3.1	Activité enzymatique de la cathepsine B dans les cellules traitées ou non à la CuE. Les valeurs représentent la moyenne de 8 échantillons provenant de 4 expériences indépendantes. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. $n = 4$. ** $P < 0,01$ vs. Ctrl.....	72
Figure 3.2	Cytotoxicité de la CuE et du MPP ⁺ sur les cellules PC12 natives. La CuE à une dose de 10^{-6} M est toxique pour les cellules. On peut aussi noter que ses effets neuroprotecteurs sont totalement abolis chez les cellules non-neuronales. Les valeurs représentent la moyenne de 6 échantillons provenant de 3 expériences indépendantes, pour un total de 18 échantillons. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. $n = 3$. *** $P < 0,001$ vs. Ctrl, ⁰⁰⁰ $P < 0.001$ vs. MPP+.....	73

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

Akt	Protéine kinase B
Atg	« Autophagy-related gene », gène relié à l'autophagie
ATP	Adénosine triphosphate
Baf	Bafilomycine A1
Cdk1	« Cyclin-dependant kinase 1 », kinase dépendante des cyclines 1
COX-2	Cyclooxygénase-2
CuE	Cucurbitacine E
DBS	« Deep-brain stimulation », stimulation cérébrale interne
ER	Récepteur aux estrogènes
GFP	« Green fluorescent protein », protéine fluorescente verte
HDAC6	Histone déacétylase 6
Hsc70	« Heat-shock cognate 70 »
LC3	« Light-chain-3 », protéine marqueur de l'autophagie
LDH	Lactate déshydrogénase
LRRK2	« Leucine rich repeat kinase 2 », kinase riche en répétitions de leucine 2
MP	Maladie de Parkinson
MPP ⁺	1-méthyle-4-phénylpyridinium
MPTP	1-méthyle-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
mTOR	« Mammalian target of rapamycin », cible de la rapamycine retrouvée chez les mammifères
NF-κB	« Nuclear factor kappa-B », facteur nucléaire kappa-B
NR4A	« Nuclear receptor subfamily 4A », sous-famille de récepteurs nucléaires 4A
PGE2	Prostaglandine E2
PINK1	« PTEN-induced putative kinase-1 », kinase putative induite par PTEN-1
PTEN	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase
ROS	« Reactive oxygen species », espèces réactives de l'oxygène
SNC	Système nerveux central
SNpc	Substance noire pars compacta
SOD	Superoxyde dismutase
STAT3	« Signal transducer and activator of transcription-3 », transducteur et activateur de signal-3
TNF-α	« Tumour necrosis factor alpha », facteur de nécrose des tumeurs alpha

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Les maladies neurodégénératives gagnent du terrain en ce début de 21^{ème} siècle. Les noms Alzheimer et Parkinson, qui étaient peu connus il y a de cela pas si longtemps, sont maintenant des mots qui font frémir tout un chacun. Avec les avancées en matière d'hygiène et de médecine moderne, l'Homme atteint des records de longévité, mais pour plusieurs d'entre nous, cela viendra à un prix. Il semble que le système nerveux humain ne puisse vieillir dans la santé face au rythme de vie et à l'environnement contemporains. S'ensuit donc l'apparition de démences et de troubles neurologiques fortement étudiés dans les dernières décennies et classifiées sous le nom de maladies neurodégénératives. Ces maladies, en bref, sont caractérisées par une mort progressive des neurones, des cellules à la durée de vie pourtant très longue, qui nous accompagnent depuis notre naissance jusqu'à la mort. Cette mort neuronale est parfois confinée à certaines régions particulières du cerveau et entraîne donc des symptômes bien particuliers selon le cas. Dans la maladie de Parkinson (MP), par exemple, ce sont les neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta qui subissent l'apoptose, ce qui engendre des désordres moteurs bien souvent handicapants. Les patients atteints de la MP n'ont d'autre choix que d'avoir recours à la pharmacologie afin de traiter leurs symptômes, ce qui n'arrête en rien la neurodégénérescence, qui se poursuit jusqu'à la mort du patient. Aucune solution n'existe à ce jour pour de telles affections. Le but de cette recherche est donc de tenter de découvrir une molécule qui permettra la protection des neurones et la prévention de l'apparition de la MP. Puisque cette maladie est incurable, une option intéressante serait tout simplement de prévenir son apparition. Compte tenu des récentes découvertes dans le domaine des molécules naturelles, nous étudions leur potentiel neuroprotecteur et promoteur de la survie neuronale dans notre modèle cellulaire de la maladie de Parkinson. Les phytostérols et les polyphénols, par exemple, sont étudiés dans notre laboratoire pour leur caractère inoffensif face aux

cellules saines et protecteur contre les affections extérieures. C'est donc à l'aide de la Cucurbitacine E (CuE), un triterpène extrait de la cucurbitacée *Ecballium elaterium*, que nous avons étudié la neuroprotection dans le contexte de la MP.

Tout d'abord, la première section de cet ouvrage portera sur la maladie de Parkinson et ses divers aspects, autant cliniques que moléculaires. Ensuite seront abordés les phytostérols et leur potentiel préventif et protecteur dans les maladies neurodégénératives. Les mécanismes cellulaires reliés à la neuroprotection seront aussi expliqués. Le cœur de l'ouvrage sera constitué d'un article scientifique résumant tous les travaux effectués sur le sujet de ce mémoire. Une petite section de résultats complémentaires viendra compléter l'article. La section Discussion portera sur les avancées proposées par ces travaux de recherche et leur impact pour la communauté scientifique, ainsi que les perspectives d'avenir pour l'étude de la Cucurbitacine E dans un contexte de neurodégénérescence. Une brève conclusion viendra clore le texte.

1.1 La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson a été décrite pour la toute première fois en 1817 par James Parkinson, dans son livre intitulé « Essay on the Shaking Palsy » (Goetz 2011). Ce n'est que bien plus tard que les fondements neurologiques de la maladie ont été découverts et explorés plus en détail. La MP est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte de neurones dopaminergiques dans la substance noire pars compacta (SNpc) (fig. 1) (Dauer et Przedborski 2003). Ces neurones forment la voie nigro-striée des noyaux basaux, qui permet le contrôle des mouvements et projette majoritairement sur le noyau putamen. Les principaux symptômes de la MP reflètent directement la déplétion en dopamine de la substance noire. Ils sont caractérisés par les tremblements, la rigidité musculaire et la bradykinésie (Société Parkinson Canada 2014). Certains symptômes sont plus rares ou se développent plus tard dans la maladie, comme la posture voûtée, l'akinésie (disparition de certains mouvements involontaires normaux) et la disparition de mimiques faciales, la baisse du volume de la voix, la difficulté à écrire (rétrécissement des lettres et de la vitesse de l'écriture). De plus, la maladie comporte souvent des symptômes psychiques comme la perte de l'initiative, la passivité,

la dépression, un délai dans les réponses cognitives et, à un stade plus avancé, la démence. Des symptômes digestifs apparaissent aussi parfois, signe d'un problème du système nerveux parasympathique.

Les symptômes psychiques, digestifs, ainsi qu'une perte de l'olfaction, peuvent survenir longtemps avant l'apparition des symptômes moteurs, ce qui rajoute une dimension plus complexe à la maladie. En effet, la perte de neurones cholinergiques peut aussi être observée chez les patients atteints de la MP et provoquerait les fréquentes dépressions reliées au prodrome de la maladie. La perte de neurones dans la circonvolution hippocampique a été reliée à plusieurs cas de démence chez les patients parkinsoniens. La perte de neurones et la présence des corps de Lewy est aussi observée dans les régions suivantes : le *locus coeruleus*, le raphé, le noyau basal de Meynert, les cortex entorhinal et cingulaire, le bulbe olfactif et le système nerveux autonome. Or, comme ces lésions ne sont pas observées dans tous les cas de MP, mais seulement dans les plus graves, elles ont été moins étudiées et leur étiologie est moins connue, puisqu'elles surviennent parfois avant les déficits moteurs associés à la perte de neurones de la voie nigro-striée. À ce sujet, la dépression, qui touche environ la moitié des patients (Stacy M 2009), survient parfois plusieurs mois avant la survenue des premiers symptômes parkinsoniens, ce qui dénote une atteinte des voies autres que la voie nigro-striée avant même que cette dernière ne démontre à son tour des symptômes de la maladie.

Il a aussi été découvert que la forme pathologique de l' α -synucléine, un marqueur spécifique de la MP, peut se retrouver dans le système nerveux entérique avant même le diagnostic (Lebouvier, Neunlist et al. 2010).

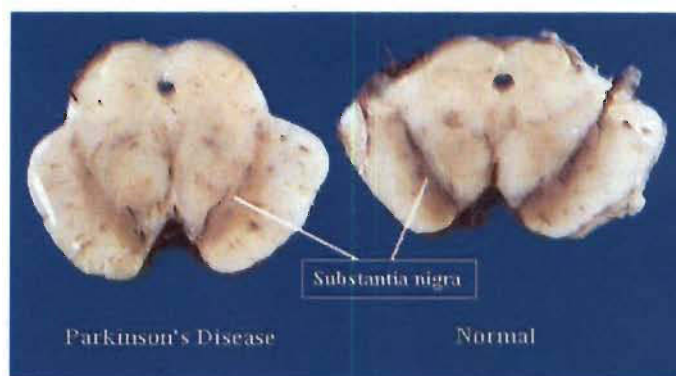


Figure 1.1 Substance noire d'un patient parkinsonien (à gauche) et d'un patient sain. La perte de la couleur brune caractéristique de la SNpc est signe d'une déplétion en neurones dopaminergiques (tiré de CNS Pathology)

1.1.1 Diagnostic

Le diagnostic de la maladie est peu aisé car les méthodes d'imagerie et d'étude du cerveau, ainsi que les tests biologiques, révèlent rarement des anomalies chez les parkinsoniens. La perte des neurones de la voie nigro-striée est beaucoup trop petite pour être détectable à l'aide de la tomodensitométrie et ne laisse pas d'empreinte sur l'électroencéphalogramme. Le diagnostic clinique de la MP repose donc sur l'évaluation des symptômes décrits ci-haut, tel que présenté dans la figure 1.2. Les troubles neurologiques entraînant des symptômes parkinsoniens, mais relevant d'une étiologie différente, peuvent donc parfois être diagnostiqués comme maladie de Parkinson. Les signes permettant de confirmer la présence de la MP sont des signes histologiques et cellulaires et peuvent donc uniquement être confirmés à l'autopsie. Il s'agit de la perte des neurones de la SNpc ainsi que la présence (qui n'est pas caractéristique de la MP) d'inclusions intracellulaires particulières, les corps de Lewy (Dauer et Przedborski 2003). Anatomiquement, l'autopsie du cerveau d'une victime de la MP révèle une dépigmentation au niveau de la substance noire. En effet, les neurones dopaminergiques contiennent de la neuromélanine, une molécule qui donne la coloration noire à la substance noire, d'où son nom. Dans la plupart des cas, la dépigmentation est latéralisée, indiquant que la perte des neurones est donc plus importante d'un côté de la SNpc en particulier. Cela se traduit cliniquement par une latéralisation des symptômes moteurs.

De nombreuses recherches tentent actuellement de permettre un diagnostic plus hâtif de la MP, afin de rendre possibles les traitements préventifs. Plusieurs études ont prouvé une perte de l'olfaction chez les patients à risque de développer des maladies neurodégénératives et se sont montrées efficacement prédictives. Or, l'olfaction ne peut malheureusement discriminer entre la MP et les autres maladies neurologiques. La dépression est aussi un symptôme hâtif, mais n'est pas non plus spécifique.

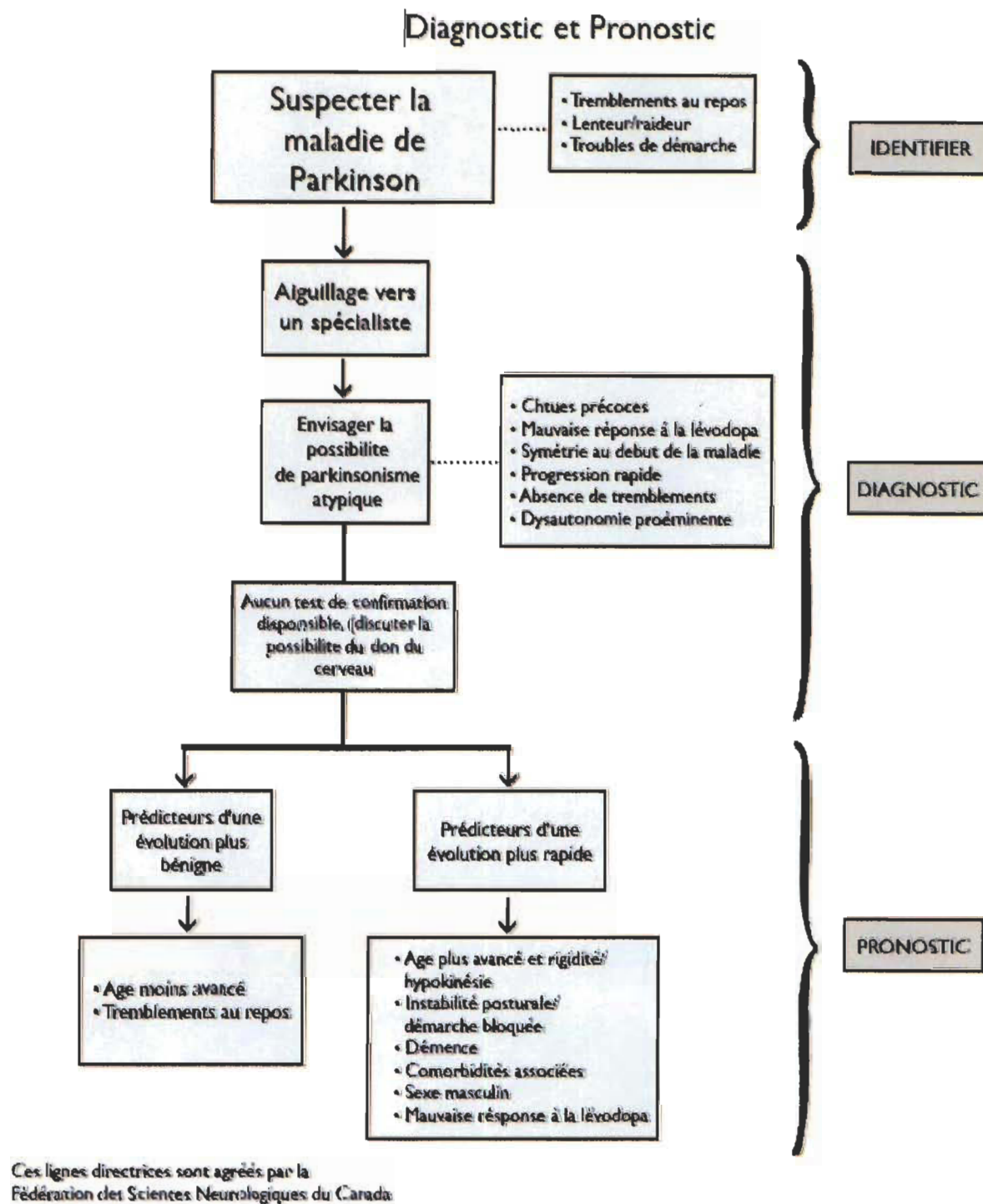


Figure 1.2 Résumé de l'identification, du diagnostic et du pronostic de la maladie de Parkinson (tiré des Lignes directrices canadiennes sur la maladie de Parkinson (Société de Parkinson Canada 2012)).

1.1.2 Épidémiologie

La maladie de Parkinson occupe actuellement le deuxième rang des maladies neurodégénératives en termes d'incidence, juste après la maladie d'Alzheimer. Sa prévalence, c'est-à-dire le nombre de cas en général sans distinction entre les nouveaux et les anciens, est de 0 à 3 % dans les pays industrialisés et de 1% dans la population âgée de plus de 60 ans. L'incidence annuelle, soit le nombre de nouveaux cas par année, est de 8 à 18 par 100 000 personnes (de Lau et Breteler 2006). La maladie se déclare rarement plus tôt que 50 ans sauf dans les cas héréditaires (environ 5% des cas) (Dauer et Przedborski 2003), mais son incidence augmente à partir de cet âge. L'âge moyen du diagnostic est de 62 ans (Stacy M 2009). La MP n'est pas répandue également à travers le globe : en effet, elle touche particulièrement les pays industrialisés et développés. L'Afrique et l'Asie, par exemple, sont deux continents moins touchés par cette maladie. Certains métiers prédisposent aussi plus particulièrement à la maladie, notamment ceux qui mettent le travailleur en contact avec des substances nocives réputées pour provoquer des syndromes parkinsoniens, comme l'herbicide paraquat et l'insecticide roténone. Les agriculteurs sont donc plus couramment touchés par la MP vu leur exposition à de telles substances.

Certaines études mentionnent que le nombre d'hommes touchés par la maladie est plus grand que le nombre de femmes, tandis que d'autres ne dénotent aucune différence. (Shulman, de Lau). La prévalence moindre chez les femmes pourrait être due à un effet neuroprotecteur des œstrogènes sur le cerveau, ce qui pourrait potentiellement ralentir la perte neuronale associée à la MP (Cyr, Calon et al. 2000). Les oestrogènes comme l'estradiol ont été démontrés comme protecteurs face aux maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et ont fait l'objet de nombreuses études cliniques (Simpkins et Singh 2008). De plus, certaines études semblent démontrer que l'incidence de la MP est amoindrie chez les fumeurs (Hernan, Zhang et al. 2001) ainsi que chez les consommateurs de café (Rivera-Oliver et Diaz-Rios 2014).

1.1.3 Pathogénèse

Deux mécanismes cellulaires font surface lorsque l'on étudie en profondeur la pathogénèse de la maladie de Parkinson. Il s'agit d'une part de la formation d'inclusions intracellulaires nommées corps de Lewy, qui sont formées par des agrégats de protéines au repliement inadéquat et rendues insolubles, et d'autre part d'un stress oxydatif multi-causal, impliquant potentiellement un mauvais fonctionnement des mitochondries, l'accumulation d'espèces toxiques dues au métabolisme de la dopamine, le mauvais fonctionnement des voies d'élimination des organites endommagés et oxydés, et ainsi de suite. Ces deux mécanismes interagissent entre eux, comme il a été prouvé dans une étude où on a pu observer que les dégâts oxydatifs sur la protéine α -synucléine entraînent son repliement inadéquat ainsi que son agrégation (Giasson, Duda et al. 2000).

1.1.3.1 *Les corps de Lewy*

Dans la forme héréditaire de la MP, plusieurs allèles ont déjà été identifiés comme étant d'importants facteurs de risque. En effet, des allèles particuliers de la protéine α -synucléine entraînent l'agrégation de celle-ci en fibrilles insolubles que l'on retrouve en grande quantité dans les corps de Lewy (Bussell et Eliezer 2001). Ceux-ci sont des inclusions intracellulaires qui séquestrent des protéines insolubles et qui peuvent prendre des proportions si grandes qu'ils en deviennent toxiques (fig. 1.3). Les protéines mal formées devraient normalement être éliminées par les processus normaux tels que l'ubiquitination et la dégradation successive par le protéasome. La formation d'inclusions et d'agrégats signifie que les processus normaux de dégradation ne fonctionnent pas ou sont débordés par la quantité de matériel à éliminer. Il y a donc accumulation d'agrégats et formation des corps de Lewy, dont la taille et la quantité peuvent poser un obstacle au transport normal des protéines et organites à l'intérieur des ramifications du neurone, entraînant à long terme sa mort. Dans la MP sporadique, les allèles entraînant la mauvaise conformation de l' α -synucléine ne sont normalement pas présents, donc la formation des corps de Lewy doit nécessairement trouver son origine

ailleurs. L'hypothèse la plus plausible vient des dégâts oxydatifs causés par le stress oxydatif trop important, qui trouve lui-même potentiellement son origine dans l'exposition à des neurotoxines dans l'environnement immédiat.

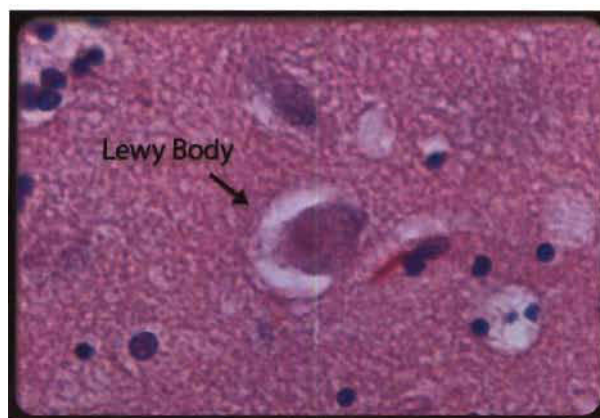


Figure 1.3 Corps de Lewy sur une coupe histologique du cerveau (tiré de Emedicine.com, 2009)

1.1.3.2 Le stress oxydant

Ce processus métabolique vient de la création d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par le métabolisme de certains composés, comme la dopamine, mais principalement par le métabolisme énergétique de la mitochondrie. Toutes les réactions métaboliques cellulaires qui font intervenir l'oxygène sont à même de produire des ROS. La formation de ces molécules toxiques est donc normale puisque nécessaire à la survie cellulaire. Le stress oxydant survient lorsque la production de ROS est trop grande ou lorsque la quantité d'enzymes antioxydantes (comme la glutathion peroxydase et la superoxyde dismutase) est trop petite (Valko, Leibfritz et al. 2007). Ses conséquences sont la liaison des ROS aux molécules cellulaires, d'où l'oxydation des protéines et la peroxydation des lipides, par exemple. Cela entraîne des dégâts pouvant altérer la fonction et la conformation autant des protéines que des lipides ou de l'ADN.

Plusieurs facteurs génétiques peuvent intervenir dans le stress oxydant, comme les polymorphismes génétiques, tels que ceux mentionnés plus haut qui touchent le cytochrome p450 et la mitochondrie en général. Aussi, une étude mentionne des observations faites sur la chaîne de transport d'électrons dans les mitochondries de

cellules plaquettaires de patients atteints de la MP. Chez ces patients, le complexe I de la chaîne de transport était beaucoup moins efficace que celui d'individus sains, laissant donc supposer un polymorphisme de l'ADN mitochondrial pouvant affecter l'efficacité de ce complexe, entraînant ainsi l'augmentation de la formation de ROS (Parker, Boyson et al. 1989).

Dans tous les cas, il convient de mentionner la part de la vieillesse dans le processus neurotoxique. En effet, avec l'âge, la capacité des cellules à détoxifier les espèces réactives et les déchets métaboliques s'amointrit, entraînant un accroissement du stress oxydant issu du métabolisme basal (Stoll, Cheung et al. 2011). Ceci est d'autant plus marqué chez les neurones puisqu'ils ne se divisent pas, donc le taux de formation de nouveaux composants cellulaires y est moindre. Ils ne peuvent non plus diviser l'accumulation de produits terminaux dans des cellules filles. De plus, le métabolisme normal de la dopamine génère lui-même des espèces réactives potentiellement toxiques, ce qui rend les neurones dopaminergiques d'autant plus sensibles au stress oxydant (Campos, Paulsen et al. 2014). Parallèlement, l'âge abaisse aussi la capacité des cellules à se débarrasser des protéines et des organites endommagés, ce qui peut intensifier leur accumulation dans le cas où les mécanismes normaux deviennent débordés (Kujoth, Hiona et al. 2005). Plusieurs études prouvent en effet, que l'autophagie cellulaire et la fonction lysosomale sont moins efficaces chez les cellules sénescentes (Lee et Wei 1997, Keller, Huang et al. 2000). Pour une revue des effets de l'âge sur les cellules post-mitotiques, voir Brunk et Terman (2002).

1.1.4 Étiologie

L'étiologie de la maladie de Parkinson est controversée. En considérant les recherches les plus récentes, il semblerait que les causes principales soient liées à des facteurs environnementaux et génétiques. La découverte de molécules neurotoxiques entraînant des symptômes caractéristiques de la MP, comme le 1-méthyle-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP), a ouvert la voie à des études statistiques portant sur l'exposition à des facteurs chimiques potentiellement toxiques pour les neurones dopaminergiques. La présence, par exemple, de paraquat, un herbicide, dans

l'environnement rural semble être associée à un risque plus élevé de développer la MP, particulièrement pour les travailleurs œuvrant dans des plantations (de Lau et Breteler 2006). Aussi, considérant que 5% des victimes de la MP développent une forme héréditaire de la maladie, plusieurs gènes qui entraînent une plus grande susceptibilité à la MP ont été découverts. Ces gènes pourraient avoir un rôle dans le repliement défectueux et l'agrégation de protéines responsables de la formation des corps de Lewy, ou bien dans l'élimination inefficace de celles-ci. La protéine α -synucléine est la principale composante des corps de Lewy. Sa localisation est principalement cytosolique, mais elle a déjà été observée dans la mitochondrie où elle peut venir entraver la phosphorylation oxydative. L' α -synucléine a tendance à se replier de façon anormale et prend ainsi des caractéristiques associées aux prions. Sa forme pathologique forme des agrégats qui dégénèrent en corps de Lewy et entravent les systèmes de dégradation normaux que sont l'autophagie cellulaire et le protéasome. De plus, il semblerait que cette forme puisse « contaminer » les protéines saines et même se répandre d'une cellule à l'autre, la rendant très difficile à endiguer. Des mutations du gène de l' α -synucléine peuvent être reliées à son mauvais repliement, ainsi que l'exposition à des facteurs aggravants comme le stress oxydant.

De nombreux gènes responsables de la MP héréditaire touchent aussi les mitochondries et la mitophagie, soit leur élimination normale à la fin de leur cycle de vie. La protéine parkin, par exemple, s'associe (Schapira et Gegg 2011) aux mitochondries dont le potentiel de membrane est anormal. Cela survient lorsque les mitochondries sont trop vieilles et doivent être dégradées. Des mutations dans parkin peuvent l'empêcher de recruter la machinerie de dégradation et provoque ainsi l'accumulation de mitochondries défectueuses et toxiques. La protéine PINK1 est aussi impliquée dans ce mécanisme puisqu'elle possède un domaine kinase qui active parkin et permet l'exécution de la mitophagie. Ces protéines et leurs mutants pathologiques interagissent donc pour provoquer une accumulation de mitochondries défectueuses qui seront, à terme, toxiques pour le neurone (Narendra et Youle 2011). La protéine DJ-1 a aussi été retrouvée dans certaines familles présentant des cas de MP transmis de façon héréditaire. Il semblerait qu'une délétion de cette protéine mitochondriale entraîne une forte hausse du stress oxydant.

En plus, certains polymorphismes dans des gènes codant pour le cytochrome P450, une enzyme impliquée dans la détoxification cellulaire, pourraient entraîner une neurodégénérescence caractéristique de la MP à un jeune âge. (Sandy, Armstrong et al. 1996)

La conséquence de ces polymorphismes serait la suivante : une capacité amoindrie des cellules à se débarrasser des espèces réactives, des molécules toxiques et des mitochondries dysfonctionnelles s'accumulant dans l'espace cellulaire suite au métabolisme normal ou à l'exposition à des facteurs chimiques potentiellement toxiques.

1.1.5 Traitements

La lévodopa est un des plus anciens traitements toujours utilisés pour traiter la maladie de Parkinson. C'est en 1961 qu'elle a été administrée à des patients pour la première fois, surprenant ainsi brillamment les chercheurs de l'époque par ses effets miraculeux qui semblaient renverser totalement les symptômes de la MP (Goetz 2011). En effet, la lévodopa est un précurseur de la dopamine. Celle-ci peut-être administrée oralement et traverse la barrière hémato-encéphalique pour atteindre le cerveau, où elle est transformée en dopamine par la dopa-décarboxylase. Puisque la MP est caractérisée par la perte des neurones produisant la dopamine, l'administration de dopamine permet donc de renverser les effets de la maladie. Ce traitement s'avérait révolutionnaire, jusqu'à la découverte, plusieurs années plus tard, que les patients traités à la lévodopa développaient des dyskinésies, des mouvements involontaires et donc incontrôlables, suite à l'administration de ce médicament durant 5 à 10 ans. Cette mauvaise nouvelle indique donc que la lévodopa ne freine pas la progression de la maladie mais constitue seulement un traitement symptomatique, ce qui a donc relancé la recherche de nouveaux médicaments pour la MP (Dauer et Przedborski 2003).

Actuellement, d'autres médicaments sont disponibles afin de traiter les symptômes de la MP, administrés parfois seuls ou en combinaison avec la lévodopa (fig. 1.4) (Ossig et Reichmann 2015). Les agonistes dopaminergiques ont des résultats semblables à la lévodopa puisqu'ils stimulent les récepteurs dopaminergiques post-synaptiques, rétablissant ainsi la signalisation neuronale. Ils sont administrés à n'importe quel stage

de la maladie. Parmi ceux-ci, l'apomorphine est l'agoniste le plus puissant, utilisé surtout pour les patients ayant des symptômes parkinsoniens depuis de nombreuses années. Aussi, certains antagonistes glutamatergiques semblent avoir un effet positif sur la MP, ainsi que certains antagonistes cholinergiques, moins utilisés de nos jours, qui permettent de réduire le tonus musculaire et donc amoindrir les tremblements. D'autres médicaments retardent l'élimination de la dopamine et de la lévodopa dans le cerveau, ce qui leur permet d'agir plus longtemps. Il s'agit des inhibiteurs de la monoamine oxydase et de la catéchol-O-méthyl transférase (Connolly et Lang 2014, Stayte et Vissel 2014).

En plus des traitements médicamenteux, certaines chirurgies sont parfois exécutées afin d'améliorer les symptômes de la MP. Quoique l'ablation ou la lésion de certaines structures cérébrales soient pratiquées beaucoup plus rarement depuis la découverte de médicaments efficaces, la stimulation de structures cérébrales internes (DBS) s'est avérée être un traitement prometteur pour la MP, particulièrement la stimulation du noyau subthalamique (National Collaborating Center for Chronic Conditions Conditions 2006). La DBS implique une intervention chirurgicale et la pose d'une électrode dans l'hémisphère cérébral le plus atteint. L'électrode stimule la région cérébrale à basse fréquence (Chen, Xiong et al. 2013) et permet donc une meilleure neurotransmission. Une petite boîte de contrôle est reliée à l'électrode et permet au patient d'ajuster la fréquence de stimulation afin d'optimiser l'élimination des symptômes. La DBS a démontré des effets positifs quant à l'amélioration de la qualité de vie des patients parkinsoniens, mais elle comporte par contre sa dose de risque, puisque le retrait des traitements de DBS sur des patients ayant été traités à long terme a entraîné dans certains cas des dépressions, pouvant parfois mener au suicide (Lagrange, Krack et al. 2002). Ces résultats malheureux ainsi que les coûts associés à l'intervention en font un traitement peu répandu.

Parallèlement, il est important pour les patients atteints de la MP, et ce dès le début de la maladie, de pratiquer l'activité physique régulièrement, comme l'exercice aérobique. Le maintien d'activités comme la marche, la natation et le jardinage, peu importe le stade de la maladie, permet de conserver une meilleure qualité de vie au fil de la progression de la maladie. Il est même possible, grâce à ces exercices, de réduire les

handicaps moteurs liés à la maladie et de permettre au patient de continuer ses activités quotidiennes (Stacy M 2009). Le maintien d'un environnement social riche et sain est aussi un facteur déterminant pour la qualité de vie du patient et la progression de la maladie. (van der Marck, Bloem et al. 2013)

Médicaments efficaces pour le traitement symptomatique précoce (actuellement disponibles au Canada)	
<ul style="list-style-type: none"> • Inhibiteurs de la MAO-B (A) <ul style="list-style-type: none"> - rasagiline - sélégiline 	<ul style="list-style-type: none"> • Agonistes dopaminergiques <ul style="list-style-type: none"> - pramipexole (A) - ropinirole (A) - bromocriptine
<ul style="list-style-type: none"> • Lévodopa (A) <ul style="list-style-type: none"> - lévodopa/carbidopa - libération immédiate - lévodopa/bensérazide libération immédiate 	<ul style="list-style-type: none"> • Amantadine (D)
	<ul style="list-style-type: none"> • Anticholinergiques (B) <ul style="list-style-type: none"> - bentrupine - éthopropazine - procyclidine - trihexyphenidyl

Figure 1.4 Traitements de la MP précoce (tiré des Lignes directrices canadiennes sur la maladie de Parkinson (Société de Parkinson Canada 2012)).

1.1.6 Neuroinflammation

Une des hypothèses de l'étiologie de la MP repose sur la découverte d'une importante neuroinflammation au niveau de la substance noire affectée par la maladie (Ouchi, Yagi et al. 2009). En effet, la perte neuronale est corrélée avec une activation de la microglie, des cellules cérébrales ayant le rôle de défendre le SNC contre les antigènes étrangers, tel que le ferait le système immunitaire. Les cellules microgliales activées sont reconnaissables grâce à la quantité de facteurs immunitaires qu'elles relâchent dans leur environnement, tels que diverses interleukines (IL-1 β , IL-2, IL-6) ainsi que le facteur de nécrose des tumeurs alpha (TNF α). Ces substances ont été retrouvées dans les coupes *post-mortem* et le liquide cérébro-spinal de patients parkinsoniens (Mogi, Harada et al. 1996, Mirza, Hadberg et al. 2000) ainsi que dans des

modèles animaux traités au MPTP (Kohutnicka, Lewandowska et al. 1998, Barcia, de Pablos et al. 2005). Or, la relâche de ces facteurs chimiques entraîne une réaction en chaîne provoquant l'activation des microglies environnantes, ce qui perpétue l'inflammation et peut aggraver la mort neuronale (Dutta, Zhang et al. 2008). De plus, les corps de Lewy, composés de fibrilles d' α -synucléine, sont couramment colocalisés avec des facteurs d'inflammation et pourraient être des catalyseurs de l'activation microgliale (Lee, Bae et al. 2014). L' α -synucléine sécrétée directement dans le milieu extracellulaire peut activer directement la microglie, dont l'activation est régulée notamment par la protéine LRRK2 (kinase riche en répétitions de leucine-2), une protéine dont des mutations sont reconnues pour provoquer la MP (Schapansky, Nardozi et al. 2014). Les liens entre la neuroinflammation et la maladie de Parkinson sont donc multiples et le mystère demeure entier quand à savoir si l'activation microgliale survient en raison d'une morte neuronale ou si elle la provoque. Pour une revue, voir Hirsch et Hunot (2009).

En cas d'invasion microbienne ou virale, l'inflammation agit naturellement comme un mécanisme de défense, mais dans le cas d'une maladie neurodégénérative, plusieurs études ont prouvé que de limiter la neuroinflammation pouvait s'avérer une stratégie neuroprotectrice. Par exemple, la délétion complète du gène de TNF α chez des souris transgéniques a montré de bons résultats face au traitement au MPTP, en limitant ses effets toxiques, ce qui met en valeur l'importance de ce facteur dans le syndrome parkinsonien (Sriram, Matheson et al. 2002). D'autre part, un nouveau composé nommé C-DIM, reconnu pour activer les récepteurs nucléaires NR4A, a été démontré comme protecteur dans la MP car les récepteurs qu'il affecte empêchent la liaison du facteur pro-inflammatoire NF- κ B à l'ADN (De Miranda, Popichak et al. 2014). Les molécules naturelles possédant des propriétés anti-inflammatoires ne sont d'ailleurs pas en reste. Nous avons étudié par le passé le potentiel neuroprotecteur du resvératrol, de la quercétine et de la sésamine sur un modèle in vitro de co-culture dans laquelle des neurones sont mis en contact avec des cellules microgliales qui ont précédemment été activées par un traitement au MPP⁺ (Bureau, Longpre et al. 2008, Bournival, Plouffe et al. 2012).

1.1.7 Prévention

Une prévention efficace de la MP devrait d'abord passer par un diagnostic précoce. Or, les méthodes de diagnostic ne sont pas encore au point afin d'identifier précisément des patients à risque de développer la maladie. L'historique familial du patient peut être un bon indice mais ne possède que très peu de spécificité.

La prévention nutraceutique vient ici jouer un rôle important malgré l'impossibilité actuelle de diagnostiquer la MP à l'avance. En effet, les maladies neurodégénératives en général guettent une large proportion de la population vieillissante et milieu développé. La prise au quotidien de molécules naturelles, via l'alimentation, serait donc un moyen efficace de réduire à long terme l'incidence de ces maladies et de permettre une meilleure qualité de vie pour les aînés. L'étude des molécules naturelles comme neuroprotecteurs vient donc remplir ce rôle puisqu'elle permettrait une baisse de l'occurrence de la maladie tout en étant plausible d'être administrée à grande échelle, de façon peu coûteuse autant pour le patient que pour le système de santé. (Ho, Poon et al. 2012, Virmani, Pinto et al. 2013, Small, Rawson et al. 2014)

Les œstrogènes ont déjà fait l'objet de plusieurs études cliniques pour leurs capacités neuroprotectrices. Ceux-ci expliquent l'incidence moindre de neurodégénérescence chez les femmes ménopausées qui se voient prescrire des suppléments oestrogéniques (Simpkins et Singh 2008). Les études cliniques à leur sujet ont malheureusement frappé un mur inquiétant : l'augmentation des cancers hormono-dépendants. En effet, l'estradiol administré après la ménopause augmente les chances de cancer du sein et de l'utérus. À ce sujet, les phytoestrogènes sont donc de bon candidats et sont actuellement étudiés afin de découvrir des molécules au potentiel neuroprotecteur n'ayant aucun effet délétère sur l'apparition de cancers, c'est-à-dire ne stimulant pas les récepteurs nucléaires aux oestrogènes.

Les polyphénols sont aussi fortement scrutés à l'heure actuelle pour leurs divers bienfaits, notamment sur le stress oxydant. Beaucoup de polyphénols sont des molécules antioxydantes qui pénètrent dans la cellule et peuvent étancher l'accumulation de ROS et/ou stimuler les défenses antioxydantes de la cellule. Il est donc maintenant reconnu

qu'une alimentation riche en antioxydants ou une supplémentation, par exemple en ginkgo biloba (Rojas, Montes et al. 2012), permet une meilleure santé du système nerveux.

Les acides gras insaturés, comme les oméga-3, ont aussi démontré des propriétés neuroprotectrices face à la mort neuronale, par exemple dans la maladie d'Alzheimer. (Zhang, Li et al. 2011, Zerbi, Jansen et al. 2014)

1.2 Le triterpénoïde Cucurbitacine E



Figure 1.5 La Cucurbitacée *Ecballium elaterium* (tiré de Viso Flora)

1.2.1 Origine

La cucurbitacée *Ecballium elaterium* est une plante sauvage indigène du bassin méditerranéen, aussi connue sous le nom de concombre d'âne, ou « squirting cucumber » (fig. 1.5). Des extraits secs de cette plante ont longtemps été utilisés dans la médecine traditionnelle de la région, par exemple en Turquie, pour le traitement de la sinusite, la constipation, les rhumatismes, la jaunisse, les otites et de nombreux autres maux (Attard 2011). Des espèces semblables se retrouvent aussi en Amérique Latine et possèdent des applications traditionnelles similaires. (Jayaprakasam, Seeram et al. 2003)

Parmi ses composés actifs, *Ecballium elaterium* contient de nombreuses cucurbitacines, des triterpènes tétracycliques contenus dans de nombreuses familles végétales comme Cucurbitaceae, Scrophulariaceae, Euphorbiaceae, Liliaceae et Elaeocarpaceae (Chen, Chiu et al. 2005). La cucurbitacine la plus présente chez *E. elaterium* est la Cucurbitacine E, aussi parfois appelée α -elaterin (fig. 1.6). Elle a été isolée à partir du jus extrait du fruit de la plante dans le laboratoire du Dr. Attard, à l'Université de Malte, puis purifiée par chromatographie (Attard et Scicluna-Spiteri 2001).

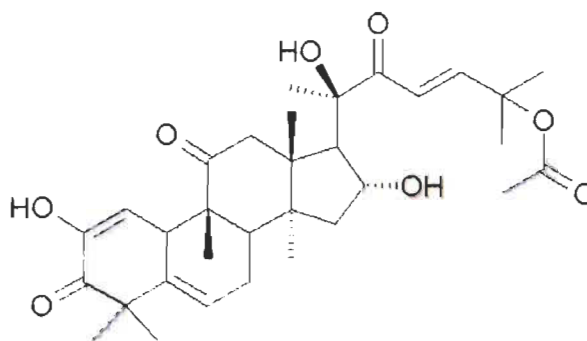


Figure 1.6 Structure moléculaire de la Cucurbitacine E (tiré de l'Institut national du cancer des États-Unis)

1.2.2 Structure et mécanismes cellulaires

Les triterpénoïdes exercent des effets biologiques très diversifiés, allant de la neuroprotection à des effets antifongiques. Les cucurbitacines sont des triterpénoïdes tétracycliques très oxygénés, ce qui leur permet d'avoir différents mécanismes d'action. Les glucosides de cucurbitacines B et E présentent d'ailleurs une bonne capacité à s'approprier les radicaux libres, ce qui leur confère un intéressant pouvoir antioxydant (Tannin-Spitz, Bergman et al. 2007). Or, les formes non-glycosilées des cucurbitacines ont échoué à démontrer des capacités antioxydantes intéressantes (Abdelwahab, Hassan et al. 2011) voire même l'inverse. Les cucurbitacines I et B, dans les expériences réalisées par le groupe de Zhang, ont démontré une capacité à induire la production de ROS mitochondriaux (Zhang, Li et al. 2012), ce qui pourrait potentiellement augmenter la dégradation cellulaire par macroautophagie (Scherz-Shouval, Shvets et al. 2007).

Les propriétés anti-inflammatoires de la CuE proviennent notamment de sa capacité à inhiber l'enzyme COX-2 (cyclooxygénase-2), une protéine pro-inflammatoire catalysant la synthèse de prostaglandines. Il a été observé que la cucurbitacine E peut inhiber l'activité de COX-2 à 35% (contre 53% pour l'ibuprofène, un anti-inflammatoire reconnu) (Abdelwahab, Hassan et al. 2011). Un autre groupe a aussi démontré une baisse de l'expression de COX-2 ainsi qu'une baisse de la production de la prostaglandine E2 (PGE2) chez les cellules A549 soumises à la CuE (Cheng, Lee et al. 2013). Sur la même lignée cellulaire, le groupe de Qiao a observé une baisse de la translocation nucléaire du facteur pro-inflammatoire NF- κ B, responsable de l'expression d'interleukines et du facteur de nécrose TNF- α (Qiao, Xu et al. 2013). Au niveau des expériences *in vivo*, la carraghénine fut utilisée comme pro-inflammatoire en synergie avec l'administration intrapéritonéale de la CuE à des rats, ce qui a permis de réduire substantiellement l'œdème de la patte, de façon dose-dépendante (Abdelwahab, Hassan et al. 2011).

Certaines recherches envisagent la CuE comme un potentiel ingrédient chimiothérapeutique puisqu'elle inhibe la croissance tumorale. Plusieurs cucurbitacines, comme la CuB et la CuI, sont des inhibiteurs de STAT3, un oncogène connu (Chan, Li et al. 2010, Zhang, Li et al. 2012). Pour sa part, la CuE oblige notamment plusieurs cellules à stopper leur cycle cellulaire en phase G2/M (Huang, Yang et al. 2012, Hsu, Huang et al. 2014). Chez le groupe de Hsu, il a été démontré que le traitement à la CuE coïncide avec une plus grande expression du facteur GADD45 γ , un facteur qui forme un complexe avec le gène Cdc2, responsable de l'expression de la protéine Cdk1 (kinase dépendante des cyclines 1), un acteur crucial du cycle cellulaire, d'où l'arrêt du cycle mitotique en phase G2/M.

Certains effets anti-cancer de la CuE sont possiblement dus à sa capacité à induire un déséquilibre dans la formation des microfilaments d'actine, ce qui limite la croissance cellulaire en empêchant la cytokinèse (Momma, Masuzawa et al. 2008). La CuE se lie directement au filament d'actine (actine-F) sur le résidu Cys257, un site d'action différent de celui de la phalloïdine, une toxine couramment utilisée pour ses effets stabilisateurs sur le cytosquelette d'actine (Sorensen, Iacob et al. 2012). Il a aussi été découvert que la CuE interagit avec la cofiline, un régulateur du catabolisme de l'actine,

afin de prévenir la dépolymérisation des filaments (Nakashima, Matsuda et al. 2010). Il s'ensuit donc une stabilisation de ces filaments polymérisés et une perte du dynamisme du cytosquelette d'actine. Cet effet réduit aussi la formation de métastases cancéreuses puisqu'il brime la mobilité cellulaire. Des études *in vivo* chez la souris ont prouvé une importante réduction des métastases de cancer du sein sur des souris traitées à la CuE (Zhang, Li et al. 2012).

Enfin, les effets neuroprotecteurs de la CuE n'ont jamais été étudiés à ce jour, sauf dans notre laboratoire. Le choix de cette molécule comme candidate potentielle repose particulièrement sur sa structure stéroïdienne qui rappelle un peu celle de l'estradiol, un excellent neuroprotecteur (Gelinass et Martinoli 2002). Le caractère hydrophobe de la CuE propose aussi qu'elle pénètre facilement les membranes cellulaires et pourrait donc passer la barrière hémato-encéphalique afin d'atteindre le cerveau chez les usagers. Certaines cucurbitacines, telles que les glucosides mentionnés plus haut, ont démontré des capacités antioxydantes qui auraient pu être intéressantes dans notre modèle, mais que ces capacités n'aient jamais été explorées chez la CuE en particulier.

1.3 L'autophagie cellulaire

Les cellules eucaryotes possèdent une espérance de vie souvent plus longue que les procaryotes et démontrent une capacité à séquestrer des réactions et des molécules dans des compartiments cellulaires distincts. Compte tenu de leur plus grande complexité, ces cellules ont développé des systèmes permettant de faire le renouvellement des composants cellulaires afin d'éviter la cytotoxicité associée aux protéines en fin de vie, souvent dénaturées, et à l'accumulation de déchets cellulaires, comme les produits métaboliques finaux. Les voies de dégradation des cellules eucaryotes sont fort nombreuses et sont essentielles au bon fonctionnement de la cellule, lors de sa progression dans le cycle cellulaire tout comme dans la sénescence.

1.3.1 Dégradation cellulaire et types d'autophagie

La voie classique de dégradation des protéines est le mécanisme ubiquitination/protéasome. Les protéines dégradées par cette voie sont celles dont la durée de vie s'achève ou dont le rôle est terminé, comme c'est le cas des cyclines lors de différentes phases du cycle cellulaire. Les cyclines sont produites afin d'enclencher une phase particulière et doivent donc être dégradées lorsque celle-ci est accomplie. Ces protéines sont « étiquetées » pour la dégradation par le protéasome. En effet, des enzymes (E1, E2, E3) placent des molécules d'ubiquitine sur les protéines à dégrader. Le protéasome est un complexe protéique en forme de cylindre grossier dans lequel les vieilles protéines, conformément ubiquitinées, entrent et sont catalysées. Elles en ressortent sous forme d'acides aminés qui seront réutilisés par la cellule dans la synthèse de nouvelles protéines. Or, le protéasome étant un cylindre, la grosseur des protéines qu'il peut dégrader est limitée. Les grosses protéines, comme les fibrilles, ainsi que les composants cellulaires et les molécules non-protéiques sont dégradées par d'autres mécanismes. (Mishra, Ur Rasheed et al. 2014)

L'autophagie est la méthode utilisée pour dégrader de grosses quantités de matériel cellulaire ou de grosses molécules, mais aussi les protéines mal repliées. Celle-ci se présente sous trois principales formes : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par les chaperones (Banerjee, Beal et al. 2010). Toutes ces voies se terminent de la même façon : les composants à dégrader se retrouvent dans les lysosomes et sont dégradés par les enzymes lysosomales, à l'instar des composés absorbés par phagocytose et pinocytose.

L'autophagie impliquant les chaperones (CMA) permet la dégradation de protéines nascentes incapables de se replier adéquatement. Dans le cytosol, des protéines chaperones protègent les peptides néo-formés du milieu cellulaire, leur permettant de se replier adéquatement. Il est possible, lors d'une mutation ou d'un dégât, par exemple oxydatif, sur le peptide qu'il ne puisse se replier afin d'adopter une bonne conformation (Ali, Nin et al. 2011). Les protéines qui pourront être dégradées de cette façon portent un motif de résidus bien particulier, soit KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) (Dice 1988), lequel est reconnu par la protéine Hsc70, qui procède à leur translocation au

compartiment lysosomal (Benbrook et Long 2012). Sur la paroi du lysosome, la chaperone Hsc70 et sa protéine se lie à la protéine transmembranaire LAMP-2A, où la protéine mal formée est dépliée et transloquée à travers la paroi du lysosome, où elle sera dégradée (Banerjee, Beal et al. 2010). Une étude mentionne l'importance de ce mécanisme dans la dégradation de l' α -synucléine dans la MP. En effet, lors de l'inhibition de la CMA, l' α -synucléine (de conformation normale, et non provenant d'un allèle pathogénique) forme rapidement des agrégats insolubles et neurotoxiques (Vogiatzi, Xilouri et al. 2008). Cette voie de dégradation pourrait donc s'avérer une hypothèse intéressante sur la pathogénèse de la MP et l'élaboration de traitements. D'autant plus que dans la MP familiale, caractérisée par des allèles défectifs de l' α -synucléine, cette dernière, lors de sa translocation vers le lysosome, se lie de manière non-covalente à LAMP-2A et inhibe ainsi la CMA en général, en plus de s'accumuler dans le cytoplasme (Mizushima, Levine et al. 2008). Pour une revue de la littérature, voir Koga et Cuervo (2011).

La microautophagie se fait directement par les lysosomes et est très ressemblante à la pinocytose cellulaire. La membrane des lysosomes s'invagine vers l'intérieur jusqu'à former une vacuole dans la lumière du lysosome, qui se détache éventuellement de la membrane externe. Cette vacuole interne, qui sera dégradée par les protéases lysosomales, contient du cytosol et en permet donc le renouvellement et le recyclage de ses composants (Huang et Klionsky 2007).

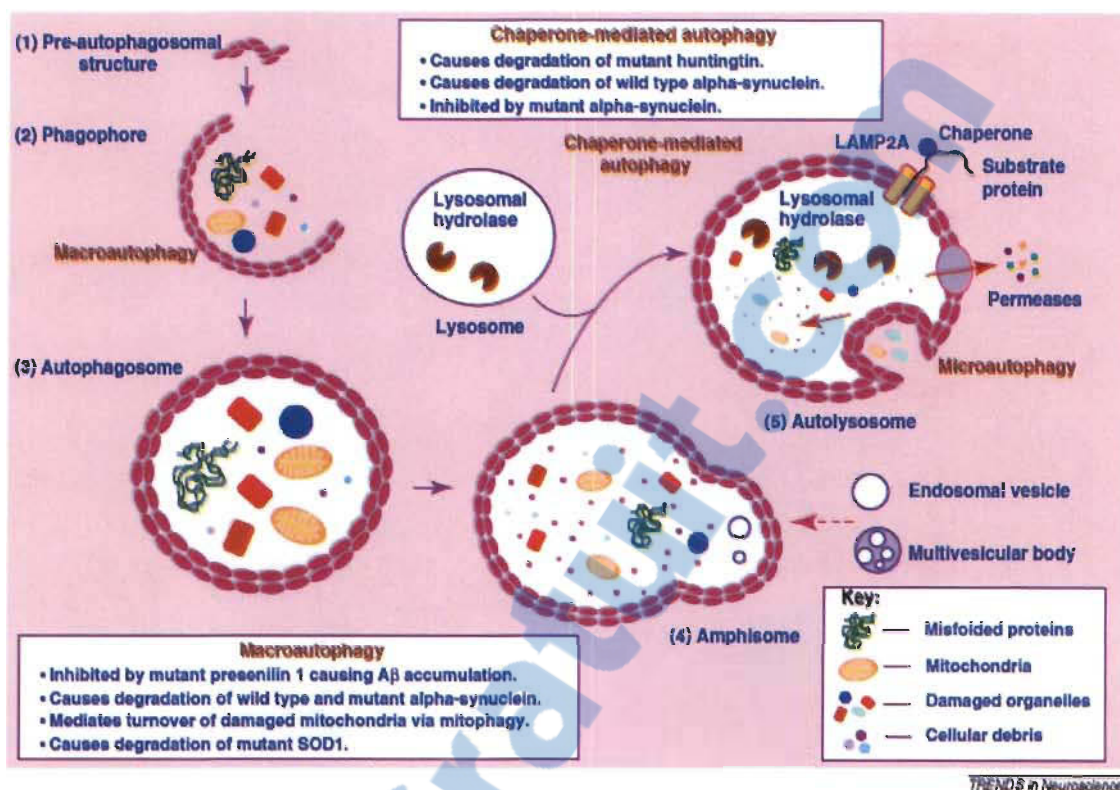


Figure 1.7 Différents types d'autophagie et les protéines impliquées dans la maladie de Parkinson. (Banerjee et al. 2010)

Enfin, le mécanisme de dégradation le plus extensif est celui de la macroautophagie, qui comporte de nombreuses étapes et permet la dégradation de très gros constituants cellulaires, comme les mitochondries (mitophagie), les peroxysomes (pexophagie) et les agrégats protéiques (agrégophagie). Le processus s'amorce par la formation d'un phagophore, une double membrane qui s'enroule autour du matériel à dégrader. Lorsque les bouts de la double membrane se joignent et fusionnent, il se forme une vacuole à double membrane, l'autophagosome. Les autophagosomes entrent dans un processus de maturation pendant lequel ils fusionnent avec des vésicules endocytiques, issues de l'internalisation de composants extracellulaires. Ces amphisomes (vacuoles nées de la fusion de l'autophagosome avec des endosomes) fusionnent éventuellement avec des lysosomes, formant ainsi des autolysosomes, dont les enzymes dégraderont tout le contenu. (Banerjee, Beal et al. 2010)

1.3.2 Mécanismes de l'autophagie

Le principal marqueur de l'autophagie, très utilisé pour sa spécificité, est la protéine LC3. LC3 possède deux formes : l'une est cytosolique et soluble, l'autre est membranaire et liée à un acide gras, la phosphatidyléthanolamine (PE). La forme soluble est recrutée au phagophore et conjuguée au PE afin d'être incluse dans la membrane d'un futur autophagosome. La détection par immunobuvardage de la forme membranaire de cette protéine est un bon marqueur de l'autophagie. Il est aussi possible de l'observer par immunofluorescence où elle marque des organites d'environ 1 micron de grosseur, incidemment les autophagosomes (Mizushima 2004). La membrane des vacuoles autophagiques possède une origine encore controversée. On y retrouve des marqueurs de différents composants cellulaires pouvant potentiellement faire don de leurs membranes au phagophore, comme les mitochondries et le réticulum endoplasmique. La protéine LC3 est donc la seule qui soit vraiment spécifique et qui permette d'identifier hors de tout doute les organites de l'autophagie.

La protéine p62 est aussi un marqueur intéressant du flux autophagique puisqu'elle est incluse dans l'autophagosome. Elle possède un domaine de liaison à l'ubiquitine qui lui permet de se lier aux agrégats protéiques à dégrader. Un autre de ses domaines se lie à LC3, lui permettant ainsi de faire un pont et d'ancrer les protéines à la membrane de l'autophagosome (voir fig. 1.8).

La microscopie électronique est une façon intéressante d'observer les autophagosomes et de les caractériser. La double membrane caractéristique de l'autophagosome, visible à fort grossissement, facilite son identification. Il est possible d'observer des vacuoles contenant des mitochondries, par exemple, et donc d'analyser leur contenu (Mizushima, Yoshimori et al. 2010). Cette méthode ne sera par contre pas utilisée dans ce rapport.

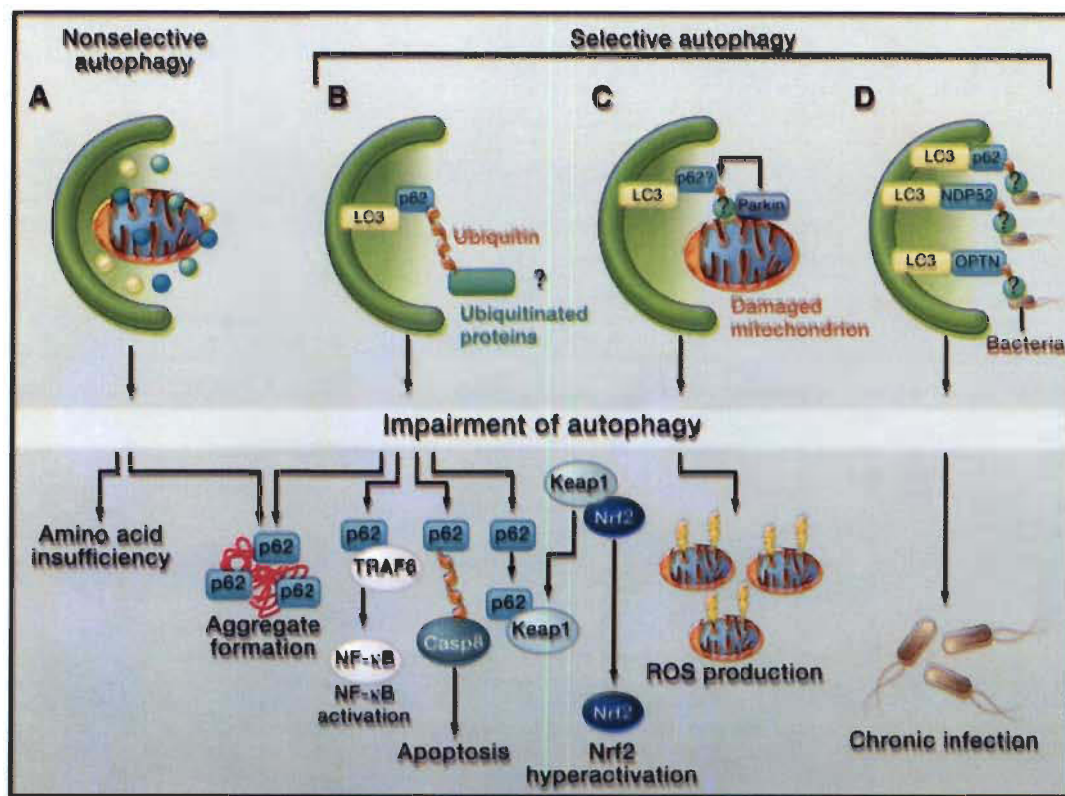


Figure 1.8 Importance et rôle de la protéine p62 dans l'autophagie sélective. (Mizushima et Komatsu 2011)

1.3.3 Autophagie et neuroprotection

L'autophagie est un mécanisme qui a fait son apparition très récemment dans les recherches sur les maladies neurodégénératives. Son implication est pourtant très importante, puisqu'elle touche autant l'accumulation d'agrégats protéiques que le stress oxydatif (Schapira et Jenner 2011).

La macroautophagie est le seul mécanisme à même de dégrader efficacement des protéines agrégées avant qu'elles ne prennent des tailles déraisonnables et qu'elles deviennent ainsi toxiques, comme on peut l'observer dans les corps de Lewy. Lorsque les protéines mal repliées se lient entre eux, comme le fait l' α -synucléine sous sa forme pathogène, il devient impossible pour le protéasome de s'occuper de leur dégradation. Dans le neurone, ces agrégats doivent être acheminés vers le soma, le corps cellulaire neuronal, où se trouvent en majorité les lysosomes et le site de formation du phagophore. À cet effet, la protéine HDAC6, une déacétylase des microtubules, sert de

régulateur à plusieurs niveaux (Yan 2014). Cette protéine marque les agrégats en se liant à l'ubiquitine qui se retrouve souvent sur les protéines de cette structure anormale (fig. 1.9). Un autre site d'HDAC6 reconnaît les moteurs de dynéine et permet donc le transport rétrograde le long des microtubules de l'axone jusqu'à la zone périnucléaire où un autophagosome pourra éventuellement engouffrer l'agrégat protéique (d'Ydewalle, Bogaert et al. 2012, Nakashima, Nguyen et al. 2014). Lorsque ce mécanisme fait défaut, la dégradation ne peut se faire efficacement et la possibilité d'engendrer des corps protéiques toxiques est augmentée. Le vieillissement, par exemple, est reconnu comme une cause de la baisse de l'efficacité du système autophagique et lysosomal (Rajawat, Hilioti et al. 2009).

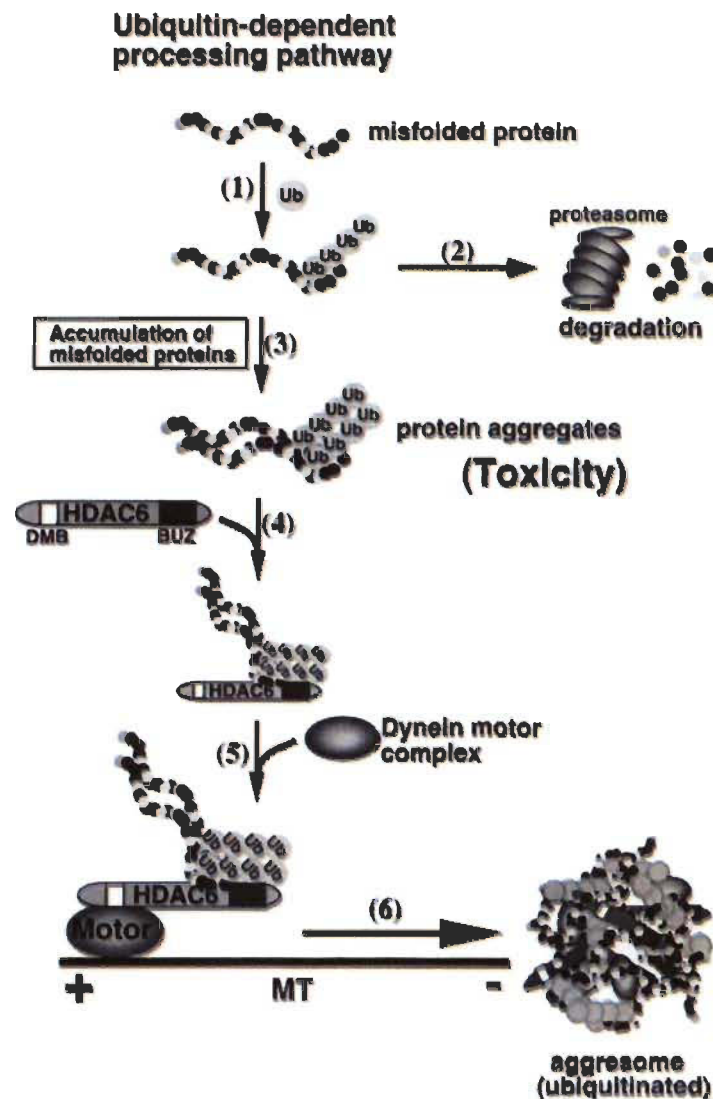
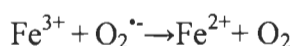
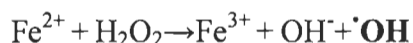


Figure 1.9 Rôle de la protéine HDAC6. (Kawaguchi, Kovacs et al. 2003)

L'autophagie possède aussi un rôle important dans la régulation des ROS et du stress oxydant (Scherz-Shouval et Elazar 2011). C'est par ce mécanisme que sont dégradées les mitochondries défectueuses. En effet, les mitochondries sont le lieu principal de la formation d'ATP et produisent donc beaucoup de radicaux libres toxiques. Elles deviennent donc à la longue oxydées et peu fonctionnelles, en plus de devenir plus toxiques. La dégradation de ces mitochondries est donc cruciale pour le neurone, qui possède déjà un métabolisme très élevé susceptible d'occuper fortement les défenses antioxydantes (Schapira et Gegg 2011). En effet, le cycle de la dopamine produit des radicaux libres dangereux à cause de l'implication de la molécule de fer dans son métabolisme. La réaction d'oxydo-réduction qui en résulte se nomme la réaction de Fenton, qui est étayée ici :



L'anion hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) résultant de cette réaction est une espèce très oxydante et fort dommageable pour tous les composants cellulaires.

Tel que discuté plus tôt, de nombreux gènes impliqués dans la MP sont reliés aux mitochondries et à leur métabolisme, comme parkin et PINK1. Une simple mutation peut faire chavirer l'équilibre fragile de la mitophagie (Lee, Nagano et al. 2010). Enfin, simplement par la dégradation de matériaux cellulaires oxydés, l'autophagie contribue à assainir la cellule de ses composants toxiques et augmente sa survie.

Plusieurs études ont prouvé jusqu'à maintenant qu'une augmentation de l'autophagie cellulaire s'avérait neuroprotectrice. Le composé rapamycine a d'ailleurs été fortement étudié pour ses propriétés pro-autophagiques. La rapamycine est un inhibiteur de la protéine mTOR (« mammalian target of rapamycin »), un régulateur cellulaire important dont l'inhibition active l'autophagie dans des conditions de jeûne. Le groupe de recherche du Dr. Rubinsztein a observé un effet protecteur de cette molécule sur l'accumulation de la huntingtine, la protéine caractéristique de la maladie de Huntington, ainsi que sur le traitement au paraquat de la drosophile, un modèle de la

maladie de Parkinson (Ravikumar, Berger et al. 2006). Les effets neuroprotecteurs de la rapamycine ont aussi été confirmés dans des cellules humaines face à la neurotoxine roténone, un insecticide reconnu pour provoquer le syndrome parkinsonien (Pan, Rawal et al. 2009). Des études plus poussées ont avancé que l'action inhibitrice de la rapamycine sur mTOR viendrait sélectivement inactiver certaines de ses actions, mais pas toutes. Il semblerait que son absence d'inhibition de la voie Akt (protéine kinase B) permettrait de maintenir la survie cellulaire, ce que les inhibiteurs complets du complexe mTOR ne peuvent faire (Malagelada, Jin et al. 2010). Pour une revue complète, voir (Bove, Martinez-Vicente et al. 2011).

L'importance de l'autophagie afin d'éliminer les composants toxiques est prouvé par certaines études, qui démontrent à l'inverse une augmentation de la mort cellulaire en son absence. Ainsi, l'inhibition de l'autophagie par la 3-méthyladénine (3-MA) dans un modèle de MP utilisant le paraquat a précipité la mort neuronale (Gonzalez-Polo, Niso-Santano et al. 2007).

Or, comme pour nombre de mécanismes, l'équilibre est la clé pour ce qui est de l'induction de l'autophagie. Trop d'autophagie, produisant une vacuolation toxique du cytoplasme, est reconnue comme néfaste pour la survie de la cellule. Il est donc possible pour une cellule de mourir de façon programmée sans passer par les mécanismes apoptotiques (Levine et Yuan 2005). L'apoptose et la mort par autophagie sont donc les deux seuls types de mort cellulaire ne créant pas d'inflammation. Dans la majorité des paradigmes cellulaires, l'autophagie est protectrice et prévient la mort par apoptose en effectuant en quelque sorte le ménage à l'intérieur de la cellule. Or, il a été observé chez certaines cellules mourantes une importante vacuolisation à l'intérieur du cytoplasme, laissant croire à une mort par surplus d'autophagie (Schweichel et Merker 1973, Debnath, Baehrecke et al. 2005). Afin d'identifier son implication dans la mort cellulaire présentée chez certains modèles, l'expérience consiste à inhiber l'autophagie, par exemple à l'aide de la 3-méthyladénine (3-MA) et d'ainsi prévenir la mort cellulaire, tel qu'exécuté dans des cellules granulaires du cervelet, par l'équipe du Dr. Canu (Canu, Tufi et al. 2005). La mort cellulaire par autophagie se nomme donc la mort cellulaire programmée de type 2 (le type 1 étant l'apoptose). Ses différences avec l'apoptose sont qu'il n'y a aucune condensation de la chromatine et une préservation de l'intégrité de

cytosquelette jusque dans les derniers instants, contrairement à l'importante vacuolisation du cytoplasme lui-même observée dans la mort apoptotique (Bursch, Ellinger et al. 2000, Zaidi, McDonough et al. 2001).

Dans les maladies du SNC, l'autophagie observée post-mortem se présente sous deux formes. Tout d'abord, dans les maladies neurodégénératives chroniques telles les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson, le blocage ou le mauvais fonctionnement de l'autophagie entraîne, à long terme, la mort cellulaire en ne permettant pas l'élimination des agrégats protéiques tels que l'amyloïde β et l' α -synucléine. Ce rôle a été démontré plus en détail à l'aide de composés augmentant le flux autophagique, comme la rapamycine, qui s'est avérée protectrice dans des modèles de ces maladies (Bove, Martinez-Vicente et al. 2011, Shen, Henry et al. 2014). D'autre part, dans les syndromes et traumatismes aigus du SNC, l'autophagie adopte un tout autre rôle bien moins protecteur. La mort par autophagie a donc été trouvée coupable dans plusieurs modèles de mort neuronale aiguë tels que les dommages pharmacologiques (Wang, Han et al. 2008), le stress oxydant (Kunchithapautham et Rohrer 2007) et l'hypoxie (Koike, Shibata et al. 2008). Pour revue, voir l'article, et tout particulièrement le tableau 4, de Jaeger et Wyss-Coray (2009).

Des molécules naturelles extraites de plantes ont déjà fait leurs preuves comme neuroprotecteurs ayant des effets modulateurs sur l'autophagie. Ces extraits agissent à différents niveaux de la voie de dégradation mais au final, ils parviennent tous à éloigner la mort cellulaire et prolonger la survie du neurone. Par exemple, la paeoniflorin, extraite de la racine de *Paeoniae alba* (Cao, Yang et al. 2010), est neuroprotectrice et augmente la dégradation de l' α -synucléine en augmentant le nombre d'autophagosomes via une modulation à la hausse de la fonction lysosomale (Sun, Cao et al. 2011). La formule médicinale coréenne Yeoldahanso-tang modifiée, qui contient une dizaine de plantes, s'est aussi avérée neuroprotectrice dans un modèle animal de la MP tout en augmentant la dégradation protéique (Bae, Ahn et al. 2011). Dans les cellules PC12, la molécule 3-n-butylphthalide, isolée des graines de *Apium graveolens*, augmente la colocalisation du marqueur autophagique LC3 et de l' α -synucléine, exprimant ainsi des propriétés neuroprotectrices (Liu, Huang et al. 2012). Une étude intéressante a aussi été effectuée sur les effets toxiques des prions. En effet, l' α -synucléine pathogène

particulière de la MP a tendance à se comporter comme un prion dans le système nerveux central, ce qui jette une lumière nouvelle sur l'étiologie de la maladie. Un traitement au resvératrol, un polyphénol extrait du raisin, est déjà reconnu pour augmenter l'autophagie mais s'avérerait aussi protecteur contre la toxicité induite par les prions (Jeong, Moon et al. 2012), ce qui est une avenue de recherche fort intéressante. La dégradation par l'autophagie permet donc non seulement l'élimination des organites toxiques comme les mitochondries défectueuses, mais aussi la dégradation des protéines pathogènes comme les prions (Rubinsztein, DiFiglia et al. 2005). Il s'agit donc d'un mécanisme crucial dans l'étude des traitements neuroprotecteurs de la MP et l'article de la section suivante s'inscrit à son tour dans cette voie.

1.4 Hypothèses et objectifs

L'objectif premier de ce travail de recherche est d'évaluer le potentiel de la Cucurbitacine E à protéger les neurones dopaminergiques de la mort engendrée par l'exposition au MPP⁺. Des tests de mort cellulaire et d'apoptose ont donc été effectués afin d'avoir une idée globale du potentiel neuroprotecteur de ce phytostérol.

Dans un deuxième temps, nous avons effectué des recherches plus pointues sur les effets de la CuE sur les cellules neuronales, avec et sans l'exposition à la toxine. Le but de ces analyses était de déterminer le mécanisme cellulaire emprunté par la molécule naturelle afin de prévenir les dommages causés par la neurotoxine. Nous avons d'abord évalué son potentiel antioxydant, qui s'est avéré peu concluant. Le corps des travaux a donc porté sur différentes analyse de l'autophagie cellulaire (macroautophagie). Des inhibiteurs pharmacologiques ont été utilisés à cet effet afin d'obtenir un portrait plus précis des conséquences cellulaires reliées au traitement des neurones avec la CuE.

Nos hypothèses sont donc les suivantes :

- Premièrement, la CuE est une bonne candidate afin d'assurer la neuroprotection dans un modèle toxique de la MP.
- Deuxièmement, la CuE emprunte l'autophagie cellulaire comme moyen permettant aux cellules de survivre dans des conditions toxiques.

Les méthodes utilisées et les résultats obtenus seront étayés en détail dans la section suivante.

CHAPITRE II

LA CUCURBITACINE E POSSÈDE DES PROPRIÉTÉS NEUROPROTECTRICES ET UNE ACTIVITÉ MODULATRICE DE L'AUTOPHAGIE SUR LES NEURONES DOPAMINERGIQUES

Le contenu de ce chapitre a été soumis pour publication le 24 juillet 2014 dans la revue anglophone *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

2.1 Contribution des auteurs

L'auteure principale, rédactrice de ces lignes, a effectué la majeure partie des expérimentations en laboratoire et rédigé l'article. Mme Fanny Longpré est à l'origine des expériences préliminaires ayant servi à évaluer le potentiel neuroprotecteur de la Cucurbitacine E. Julie Bournival et Cindy Tremblay ont poursuivi les expériences de survie cellulaire et de neuroprotection. Julie Demers-Lamarche a fourni des matériaux et une aide précieuse pour les expériences sur l'autophagie. Pavlina Haskova a effectué le dosage de l'ADN simple brin afin d'évaluer l'apoptose cellulaire. Le Dr. Everaldo Attard a gracieusement fourni les échantillons de CuE. Le Dr. Marc Germain a prodigué de précieux conseils face aux expérimentations d'activité autophagique et a généreusement révisé le manuscrit de cet article. La Dre Maria-Grazia Martinoli est à l'origine du projet et a su prodiguer toutes les ressources, matérielles, humaines et les connaissances, nécessaires à la réalisation de ce projet, en plus d'avoir révisé en profondeur le manuscrit.

2.2 Résumé de l'article

Cet article consigne les recherches effectuées sur le potentiel adjuvant de la molécule Cucurbitacine E (CuE) dans un modèle *in vitro* de la maladie de Parkinson. La

CuE est un triterpène isolé à partir de la cucurbitacée *Ecballium elaterium* et qui possède des effets anti-tumoraux et anti-inflammatoires. Nous avons utilisé les cellules PC12 neuronales comme modèle de neurones dopaminergiques qui furent soumises à la neurotoxine MPP⁺. Il fut démontré que la CuE administrée en prévention aux cellules neuronales permettait de les protéger des effets cytotoxiques du MPP⁺ et réduisait les taux d'apoptose. Des tests d'oxydation, utilisant notamment le diéthylthiocarbamate (DDC) comme pro-oxydant, ont évalué les effets antioxydants de la CuE dans notre modèle neuronal. Or, le phytostérol CuE n'a su démontrer de propriétés préventives à ce niveau. En plus de présenter des facultés neuroprotectrices intéressantes, la CuE a aussi présenté une activité modulatrice de la fonction autophagique, un mécanisme de dégradation et de recyclage des organites et protéines en fin de vie ou endommagés. Des expériences d'immunofluorescence et d'immunobuvardage de type Western sur des protéines cruciales comme LC3 et p62 ont permis de préciser les effets de la CuE dans notre modèle parkinsonien. Au final, il semblerait que la CuE possède des effets neuroprotecteurs médiés par une modulation de la fonction autophagique favorisant potentiellement la maturation des vacuoles dégradatives.

2.3 Cucurbitacin E has neuroprotective properties and autophagic modulating activities on dopaminergic neurons.

Anne-Marie Arel-Dubeau¹, Fanny Longpré¹, Julie Bourniva¹, Cindy Tremblay¹, Julie Demers-Lamarche¹, Pavlina Haskova¹®, Everaldo Attard², Marc Germain¹, Maria-Grazia Martinoli^{1,3*}

¹ Cellular Neurobiology, Dept. of Medical Biology, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Canada

² Institute of Earth Systems, University of Malta, Msida, Malta

³Dept of Psychiatry and Neuroscience, Laval University and CHU Research Center, Québec, Canada

® Present address: Dept. of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague, Czech Republic.

Key words: cucurbitacins, neuroprotection, neurodegeneration, autophagy, oxidative stress, apoptosis, Parkinson's disease.

Abstract

Natural molecules are under intensive study for their potential as preventive and/or adjuvant therapies for neurodegenerative disorders, such as Parkinson's disease (PD). We evaluated the neuroprotective potential of Cucurbitacin E (CuE), a tetracyclic triterpenoid phytosterol extracted from the *Ecballium elaterium* (Cucurbitaceae), using a known cellular model of PD, NGF-differentiated PC12. In our post-mitotic experimental paradigm, neuronal cells were treated with the parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) to provoke significant cellular damage and apoptosis, or with the potent *N,N*-diethyldithiocarbamate (DDC) to induce superoxide (O₂^{•-}) production. CuE was administered prior and during the neurotoxic treatment. We measured cellular death and reactive oxygen species to evaluate the antioxidant and anti-apoptotic properties of CuE. In addition, we analyzed cellular macroautophagy, a bulk degradation process involving the lysosomal pathway. Neuroprotective effects of CuE were observed by a reduction of MPP⁺-induced cell death and apoptosis. However, antioxidant assays failed to demonstrate the ability of CuE to rescue neuronal cells from oxidative stress induced by MPP⁺ or DDC. Microscopy and Western blots data show an intriguing involvement of CuE in maintaining lysosome distribution and decreasing autophagy flux. Altogether these data indicate that CuE decreases neuronal death and autophagic flux in a post-mitotic cellular model of PD.

Introduction

Mitochondrial dysfunction has been recently recognized to contribute to the onset of many neurodegenerative diseases characterized by and protein aggregation, cellular inclusions and impairment of metabolic functions and cellular trafficking¹⁻³. In Parkinson's disease (PD), for example, these effects lead to the degeneration of the nigrostriatal dopaminergic (DAergic) pathway characterized by the selective death of DAergic neurons and dopamine content depletion⁴. The hypotheses regarding the

etiology of PD pinpoint mitochondrial defects and oxidative stress, ranging from mutations in proteins regulating mitochondrial turnover to functional impairment of the respiratory chain ^{5, 6}. Moreover, the formation of the characteristic protein inclusions of PD, Lewy bodies, illustrates the challenge of protein misfolding and aggregation, not rescued by cellular degradation mechanisms ⁷.

The autophagy-lysosomal degradation pathway, which is essential for turnover of mitochondria (mitophagy) and degradation of aggregated proteins (aggrephagy), has been linked with the development of neurodegenerative disorders ⁸⁻¹¹. Its impairment leads to formation of protein inclusions and accumulation of damaged mitochondria, a known cause of reactive oxygen species (ROS) formation ^{12, 13}. ROS can then oxidize proteins, eventually inducing their misfolding and aggregation, as well as trigger the apoptotic cascade. Protein inclusions and accumulation of damaged mitochondria have been observed for decades in the brains of PD patients ^{4, 14}. Impaired autophagy has also been observed in animal models of PD and in human post-mortem brain sections ^{15, 16}. Mutations in genes associated with familial PD, such as parkin, PINK1, LRRK2 and DJ-1, impair mitochondrial turnover and protein aggregate clearance ¹⁷⁻²⁰. Hence, the accumulation of protein aggregates and toxic mitochondria in the cytoplasm may prompt increased oxidative stress and, over time, cell death and apoptosis.

Impairment of the respiratory chain complex I found in PD brains ^{21, 22} is reproduced by treatment with 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺), the active metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), a neurotoxin which causes a Parkinson-like syndrome in many model organisms as well as in humans ²³⁻²⁵. MPP⁺ crosses the blood-brain barrier and is converted into toxic MPP⁺ in astrocytes by the enzyme monoamine oxidase B ⁴. It is then incorporated by dopaminergic (DAergic) neurons via the dopamine transporter (DAT) and interferes directly with complex I of the respiratory chain in the mitochondrion ²⁶⁻²⁷, leading to production of ROS, oxidative stress and apoptosis.

In the last decade, a growing number of studies have revealed that several natural molecules possessing interesting antioxidant and anti-apoptotic properties in neuronal cell culture as well as in animals model of neurodegeneration that may improve cognitive health in humans ^{23, 28-35}. Among them, cucurbitacins, triterpene steroids

extracted mainly from the Cucurbitaceae plant family, have been studied for their anti-tumoral, anti-inflammatory and antioxidant properties³⁶⁻⁴⁰. In particular, Cucurbitacin E (CuE) has been reported to possess anti-inflammatory and antiproliferative properties⁴¹, effects mediated by its action on the polymerisation of the actin cytoskeleton⁴²⁻⁴⁵.

The aim of this work was to evaluate CuE as a preventive treatment for the onset of neuronal death induced by the potent parkinsonian toxin MPP⁺ in a neuronal DAergic model. We first assessed CuE against MPP⁺-induced cellular death. Then, we examined the antioxidant properties of CuE, and finally we investigated the autophagic degradation pathway as a potential mechanism for CuE neuroprotection. Modulation of autophagic markers and autophagic flux observed in the presence of CuE encourages a hypothesis toward this mechanism of neuroprotection in our neuronal cell culture. To our knowledge this is the first time that CuE is used in a post mitotic neuronal model and shows neuroprotective, anti-apoptotic as well as autophagic regulating properties.

Materials and Methods

Drugs and Chemicals

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

Cucurbitacin E extraction and purification

CuE was extracted from the fruit juice of *Ecballium elaterium* (L.) A.Rich., collected from Marsascala (Malta) with a yield of 52% from the prepared elaterin. Briefly, the fruit juice was dried at 40 °C and extracted with CHCl₃ (5 ml) and then mixed with an equal volume of petroleum ether. The filtrate was dissolved in absolute EtOH and then filtered through a 0.22 µm pore size membrane. The purity of the compound (98.24%), was analysed by spectroscopy and HPLC⁴⁶.

Cell culture and treatments

PC12 cells, obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD), were maintained in a humidified environment at 37°C and 5% CO₂ atmosphere. They were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated horse serum (HS), 5% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and gentamicin (50 µg/ml). Neuronal PC12 cell differentiation was evoked by nerve growth factor-7S (NGF, 50 ng/ml) in DMEM supplemented with 1% FBS for 5 days (Fig. 1A), as already described^{28, 47}. In these conditions, 85% of naïve PC12 differentiated into neuronal cells. Treatments with CuE and MPP⁺ were performed in DMEM medium without phenol red supplemented with 1 % charcoal-stripped FBS. Cells were pre-treated with CuE 10⁻¹⁰M for 3 h and then exposed to 5 mM or 500 µM MPP⁺ for 24h⁴⁸. CuE 10⁻¹⁰ M was added once more 15 min. after MPP⁺ administration, as illustrate in Figure 1 B. Neuroprotective CuE concentration was determined by dose-response experiments (Fig. 2). Administration of CuE alone induced only minimal cellular death (Fig.3). Bafilomycin A₁ (Baf) 100nM or rapamycin (Rap) (500 nM), were used as positive autophagy controls. Bafilomycin inhibits lysosomal autophagosome degradation and provokes the accumulation of autophagic vacuoles in the cytoplasm^{49, 50}. Rapamycin is an inhibitor of the Ser/Thr protein kinase named "mammalian target of rapamycin" (mTOR) and is an inducer of autophagy⁵¹. Both were used separately on live cells 1 hour prior to extraction or fixation (Fig. 1B). All experiments were performed in charcoal-stripped serum to remove steroids from the medium.

Cytotoxicity measurements

Cytotoxicity was evaluated by a colorimetric assay based on the measurement of supernatant lactate dehydrogenase (LDH) activity, as already described²⁸. The amount of enzyme activity detected in culture supernatant correlates with the portion of lysed cells⁵². Briefly, 50 µL of cell-free supernatant were harvested to quantify LDH activity by measuring absorbance at a wavelength of 490 nm with a microplate reader (Thermolab Systems, Franklin, MA). Total cellular LDH was determined by lysing the

cells with 1% Triton X-100 (high control); the assay medium served as the low control and was subtracted from all absorbance measurements.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{experimental value} - \text{low control}}{\text{high control} - \text{low control}} \times 100$$

Specific apoptotic DNA denaturation detection

Specific detection of DNA denaturation was studied using the single-stranded DNA (ssDNA) Apoptosis ELISA kit (Chemicon International, Billerica, MA), as already reported^{47, 53}. This procedure is based on selective DNA denaturation by formamide and heat in apoptotic cells that does not occur in necrotic cells or in cells with DNA breaks in the absence of apoptosis⁵⁴. The detection of denatured DNA was performed with a monoclonal antibody highly specific to ssDNA and a peroxidase-labelled secondary antibody on fixed neuronal PC12 cells, seeded at 25 000 cells/cm² in 96-well plates. The reaction was then stopped with a hydrochloric acid solution and ssDNA was quantified by measuring absorbance at 405 nm in a microplate reader (Thermolab Systems). ssDNA was analyzed with reference to control conditions. Absorbance of positive (wells coated with ssDNA) and negative controls (wells coated with S1 nuclease) served as quality controls for the ELISA assay, as previously described^{47, 53}.

ROS detection

The antioxidant effect of CuE against MPP⁺-induced ROS production was evaluated by the dihydrorhodamine 123 (DHR) assay and MitoSOX Red (Invitrogen, Burlington, On, Canada), according to a previously-described method⁵⁵. Briefly, to detect OH•, NO₂•, CO₃•-, H₂O₂, HOCl and ONOO- by DHR^{56, 57}, NGF-differentiated PC12 cells were grown and treated on collagen-coated circular glass coverslips. Then, they were quickly washed with PBS 0.1 M and exposed to 250 µL of DHR at 37°C for 20 min. Slides with live cells were immediately examined under a Leitz Orthoplan fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany) and photographed with a QImaging camera (Nikon, Mississauga, On, Canada), as already described⁵⁵. Fluorescence intensity was measured using NIS Elements 2.2 software (Nikon).

The antioxidant effects of CuE against mitochondrial superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) production were evaluated with MitoSOXTM Red, as already described^{55, 47}. NGF-differentiated PC12 cells were washed with Hank's buffered salt solution (HBSS) and incubated for 10 min at 37°C with a 5 μ M solution of MitoSOXTM Red. Nuclei were counterstained in with Hoescht 33342 (5 μ g/ml) for 15 min at 37°C, and then cells were fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde at 37°C, mounted on glass slides with Prolong Antifade kit (Invitrogen) examined under a Leitz Orthoplan fluorescence microscope (Leica) and photographed with a QImaging camera (Nikon). Fluorescence intensity was measured using NIS Elements 2.2 software (Nikon). To demonstrate MitoSOXTM Red selectivity, a positive control was performed using sodium diethyldithiocarbamate (DDC), a superoxide dismutase (SOD) inhibitor, in control medium.

Immunofluorescence

NGF-differentiated PC12 cells were grown and treated on collagen-coated circular glass coverslips in 24-well plates. Cells were fixed for 20 min at 37°C in 4% paraformaldehyde, then washed and incubated for 1 h at room temperature (RT) in a blocking and permeabilizing solution, as already described^{47, 55}.

For lysosomes and mitochondria detection, coverslips were incubated overnight with lysosome-associated membrane protein-2a (LAMP2, Novus Biologicals NBP1-95696) and with mitochondria-specific heat-shock protein-70 (mtHSP70, ABR Bioreagents MA3-28) antibodies respectively, followed by fluorescent secondary antibodies (Alexa Fluor 488 and 594, Jackson ImmunoResearch). Slides were examined under a Zeiss confocal microscope using ZEN Imaging software (Zeiss, Toronto, On, Canada).

Immunofluorescence detection of the cellular cytoskeleton was performed by exposing fixed cells with anti-actin 1:1,000 (Sigma A2066), anti- β 3-tubulin 1:1,000 (Santa Cruz Biotechnology sc-80005), anti-neurofilament-M 1:3,000 (NF-M, Sigma N5264), antibodies followed by the appropriate anti-rabbit fluorescein isothiocyanate (FITC, Sigma F0382) or anti-mouse Cy3 (Sigma C2181) fluorescent secondary

antibodies and DAPI nuclear staining. Slides were examined under a Zeiss confocal microscope using ZEN Imaging software (Zeiss).

Recently, detecting microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3) has become a reliable method for monitoring autophagy and autophagy-related processes⁵⁸. The amount of LC3-II is clearly correlated with the number of autophagosomes⁵⁹. We used immunofluorescence on neuronal PC12 grown and treated on coverslips, and then exposed overnight with a primary antibody for LC3b 1:250 (Cell Signaling Techn. 3868) at 4°C. After washing with PBS, cells were exposed to the fluorophore-conjugated secondary antibody, anti-mouse Cy3 (Invitrogen A-21467). Finally, coverslips were mounted on glass slides with Prolong Antifade kit (Invitrogen) and examined under an Olympus Corp. FV1200S confocal microscope using Fluoview10-ASW 4.0 software (Olympus, Richmond Hill, On. Canada). Percentage of cell occupied by puncta stained with LC3b (area fraction) was quantified using ImageJ free software (imagej.nih.gov).

Analysis of autophagosomes

The vital dye acridine orange and the specific autophagy epifluorescent dye Cyto-ID (Enzo Life Sciences) were used for autophagy detection. Acridine orange is a lysotropic dye that accumulates in late acidic autophagic vacuoles⁶⁰. Cyto-ID is dye for autophagosomes⁶¹⁻⁶³.

NGF-differentiated PC12 cells were seeded at 25 000 cells/cm² and treated on collagen-coated circular glass coverslips in 24-well plates. Acridine orange or Cyto-ID staining was performed immediately after experimental treatments on live cells, according to manufacturer's instructions. Positive control for autophagy was rapamycin (500 nM), a known mTOR inhibitor and autophagy inducer. All coverslips were rinsed with PBS and nuclei counterstained with Hoechst 33342 (5 µg/ml), then cells were fixed with 4% paraformaldehyde and mounted on glass slides with Prolong Antifade kit (Invitrogen). Cells were observed with a Leitz Orthoplan microscope (Leica) and photographed with a QImaging camera (Nikon). Fluorescence intensity was measured by NIS Elements 2.2 software (Nikon) for acridine orange. Vacuole larger than 1 µm

stained with Cyto-ID were blindly counted on 10 different optic fields from at least 3 slides per group⁴⁸ using ImageJ free software (imagej.nih.gov).

Electrophoresis and immunoblot analysis

NGF-differentiated PC12 cells were grown and treated in collagen-coated 6-well plates. Total cellular proteins were extracted using Nuclear Extraction kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA). Cells were lysed in 50 μ L lysis solution and protein concentration of the supernatant was quantified by BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Equal amounts of proteins were loaded onto 10% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gels. After electrophoretic separation (125 V, for 1h30), proteins were transferred onto PVDF membranes (0.22 μ m pore size, BioRad, Mississauga, On, Canada) at 25 V overnight. The membranes were blocked for 30 min to 1h at RT and incubated overnight at 4°C with primary antibodies anti-p62, a cargo protein, 1:1000 (Progen Biotechnik GmbH, GP62-C) and anti-tyrosine hydroxylase (TH) 1:2000. Membranes were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, diluted 1 : 10 000 for 1h30 at RT. Immunopositive signals were visualized by enhanced chemiluminescence with the AlphaEase FC imaging system (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA) and analyzed with AlphaEase FC software (Alpha Innotech) and ImageJ (imagej.nih.gov). TH is the enzyme responsible for the conversion of L-tyrosine to [L-3,4-dihydroxyphenylalanine](#) (L-DOPA) which is the precursor for dopamine. TH is found ubiquitously in neuronal differentiated PC12 and was used to normalise the p62 signal as in our experiments CuE does not modulate TH expressions (data not shown).

Statistical analysis

Significant differences between groups were ascertained by One-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-hoc analysis, achieved with the GraphPad InStat program, version 3.06 for Windows (<http://www.graphpad.com/>). All data, analyzed at the 95% confidence interval, were expressed as means \pm SEM from at

least 3 independent experiments. Asterisks indicate statistical differences between MPP⁺ and control (*** P < 0.001, ** P < 0.01, * P < 0.05) and diamonds denote statistical differences between the treatment and MPP⁺ or Baf condition (⁰⁰⁰ P < 0.001, ⁰⁰ P < 0.01, ⁰ P < 0.05).

Results

CuE treatment reduces MPP⁺ -induced cell death

The neuroprotective effects of CuE on PC12 neuronal cells (Fig. 1 A) submitted to MPP⁺ was assessed by measuring LDH release. Experimental CuE concentrations were determined by a dose-response assay aimed at finding the lowest neuroprotective dose of CuE in neuronal PC12 cells (Fig. 2). After a 24 h treatment with 5 mM MPP⁺, cell death was significantly higher in MPP⁺-treated cells than in cells treated with MPP⁺ and CuE concentrations ranging from 1 μ M to 1 pM (Fig. 2). Figure 3 A shows that treatment with CuE 10⁻¹⁰ M reduced MPP⁺-induced cellular death (CuE + MPP⁺) by 70%, while treatment with CuE alone slightly affected cell death (CuE).

Neuronal death was also detected by a specific DNA denaturation assay (Fig. 3 B). After a 24 h treatment with 500 μ M MPP⁺, specific apoptotic DNA denaturation increases by 44% compared to control condition (Ctrl). CuE administration reduced significantly the amount of DNA denaturation (CuE + MPP⁺) while CuE treatment alone caused no significant changes (Fig. 3 B).

CuE does not significantly lower oxidative stress

DHR is oxidized to fluorescent rhodamine by free radicals such as OH[•], NO₂[•], CO₃^{•-}, H₂O₂, HOCl, and ONOO⁻ ^{56, 57}. Figures 4 A and 4 B illustrate that fluorescence levels were significantly higher after MPP⁺ treatment compared to control conditions, sustaining the oxidative nature of the MPP⁺ neurotoxin ^{55, 47}. CuE alone did not modulate rhodamine fluorescence and the administration of CuE with MPP⁺ (CuE +

MPP⁺) failed to significantly lower free radical levels compared to MPP⁺ alone, in our post-mitotic neuronal paradigm (Fig. 4 A and B).

To further study the anti-oxidant potential of CuE, we measured its ability to quench ROS generated by the inhibition of superoxide dismutase (SOD) using MitoSOX RedTM (Fig. 5 A and B). Cells were treated with or without vehicle, CuE or DDC, a potent SOD inhibitor, for 3 h as already reported^{55, 47}. This time period was considered since free radical generation and eventually oxidative stress are early events in the causative process of cellular death^{64, 65} and experimentally generated the best detectable superoxide levels^{55, 47}. Figures 5 A and 5 B show that fluorescence levels were, as expected, the highest in DDC-treated cells and that CuE treatment could not revert the superoxide anion levels induced by the inhibition of SOD (DDC + CuE), thus suggesting that CuE had no preventive effect on superoxide anion levels. Control conditions display low level of red fluorescence and CuE treatment alone shows similar low levels.

CuE regulates the presence of autophagic vacuoles

Since CuE acts as a neuroprotective molecule but does not play an antioxidant role to promote neuronal survival in our post-mitotic model, we examined whether CuE could modulate autophagy, a cellular process allowing the degradation and recycling of cellular components and thus playing an important role in neuronal survival. We first analysed the effect of CuE and MPP⁺ on the presence of acidic vesicles as illustrated by acridine orange red fluorescence (Fig. 6 A and B). Consistent with a depletion of lysosomes by MPP⁺⁶⁶, Fig. 6A and B illustrate a dramatic decrease in acridine orange-positive vesicles when PC12 neuronal cells were exposed to MPP⁺. In contrast, CuE caused an accumulation of acidic vesicles, although it did not rescue acridine orange staining in MPP⁺-treated cells (CuE + MPP⁺), thus suggesting that CuE may act on the autophagy-lysosomal pathway. We then analysed the presence of autophagic vacuoles using Cyto-ID, a green fluorescent dye that accumulates in autophagic vacuoles but not lysosomes⁶¹⁻⁶³ (Fig. 7 A and B). Although CuE treatment did not alter the overall number of Cyto ID-positive vacuoles (Fig. 7A), it provoked the accumulation of large (>1 μ m) vacuoles in neuronal PC12 cells (fig. 7B). In addition, and in contrast to the

staining of acidic vacuoles with acridine orange shown in fig. 6, CuE prompted the accumulation of large Cyto-ID positive vacuoles ($>1\ \mu\text{m}$) even in the presence of MPP^+ (CuE + MPP^+), suggesting that CuE may regulate autophagy upstream of lysosomes. Rapamycin, a known inducer of autophagy, was used as positive control for Cyto-ID staining. Altogether, these results suggest that CuE regulates the autophagolysosomal pathway.

To directly address the effect of CuE on the formation of autophagosome, we then tested its effect on the accumulation of vesicles positive for the specific autophagosomal marker LC3^{58,59}. Upon induction of autophagy, LC3 becomes lipidated, associates with a nascent autophagosome and stays associated with the autophagosome until it is degraded within a lysosome. Therefore, we stained neuronal PC12 cells for LC3 and determined the presence of LC3-positive autophagic vacuoles by immunofluorescence (Fig. 8 A and B). On its own, CuE treatment decreased the number of LC3-positive autophagosomes, suggesting that CuE inhibits autophagy (Fig. 8 B). Importantly, inhibition of lysosomal activity with bafilomycin to prevent degradation of the autophagosomes failed to rescue LC3-positive vesicles in CuE-treated cells. These results suggest that the decrease in autophagosomes observed in CuE treated cells is the consequence of reduced autophagy rather than an increase in autophagic flux. To further demonstrate that CuE decrease autophagy, we measured the expression of the autophagy substrate p62 by Western blotting (Fig. 9). Consistent with an inhibitory effect on autophagy, CuE caused the accumulation of p62 in neuronal cells. As with LC3-positive autophagosomes, inhibition of lysosomal acidification with bafilomycin (Baf, Fig. 9) increased p62 levels in control cell but did not further increase them in CuE-treated cells. Altogether, our results indicate that CuE decrease autophagic flux.

CuE reverts abnormal relocalization of lysosomes induced by MPP^+ treatment.

We then tested the effect of CuE on lysosomal and mitochondria subcellular distribution. Lysosomes and mitochondria were visualised using an antibody against the lysosomal membrane protein LAMP2a or against mtHSP70 for mitochondria (Fig. 10). MPP^+ treatment resulted in a strong lysosomal clustering (green) in the perinuclear

region of the cells (Fig.10, MPP⁺, arrowheads). Figure 10 shows mitochondria stained with the mtHSP70 in red (second line) and also illustrates that mitochondria are pushed away from the perinuclear region by the green lysosomal clusters (Fig. 10, merge and zoom 2x). As previously shown in Figure 6, where MPP⁺ caused a dramatic decrease in acridine orange-positive vesicles consistent with lysosomal loss, neuronal cells treated with MPP⁺ and stained with LAMP2a indicate a strong impairment of lysosome distribution (Fig. 10). Figure 6 also showed that CuE and MPP⁺ (CuE + MPP⁺) could not rescue the number of acridine orange-positive vesicles (Fig.6, histogram). However, administration of CuE + MPP⁺ could indeed reverse lysosomal clustering as illustrated in Fig. 10 by specific LAMP2a staining (CuE + MPP⁺, zoom 2x) and increases the number of large Cyto-ID-positive vesicles (Fig. 7, histogram). These results indicate that, while CuE does not directly promote lysosomal acidification, it may regulate the formation of other types of autophagolysosomal vesicles that correlate with improved survival.

CuE does not visibly alter the neuronal cytoskeleton

Since autophagy requires the presence of an intact cytoskeleton⁶⁷, we analysed the effect of CuE on neuronal PC12 cell cytoskeleton. As shown in Figure 11, CuE did not visibly affect the actin cytoskeleton, indicating that the accumulation of autophagic vacuole is not produced by an altered actin cytoskeleton (Fig. 11, red staining). As organelle movement normally depend on microtubules, we also analysed the influence of CuE on β 3-tubulin staining. As with actin, a 24 h treatment with 10⁻¹⁰ M CuE did not visibly alter microtubules (Fig. 11, green staining) or intermediate filaments, represented by NF-M (purple staining), indicating that, at the concentration used, CuE does not affect the cellular cytoskeleton in our post mitotic cellular paradigm.

Discussion

This study details for the first time the effects of CuE, a molecule from the cucurbitacin family, in a context of neuroprotection. Cucurbitacins, phytosterols found mostly in cucurbits, are currently studied for their important anti-cancer potential^{41, 43, 68, 69}. Some of these compounds also possess interesting anti-inflammatory and antioxidant properties in mitotic cell lines^{70, 71}. CuE, in particular, has been proven to have a signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) -inhibiting effect⁴⁰ and an important actin-binding activity that stabilizes microfilaments⁴², leading to cell cycle arrest and apoptosis in rapidly-dividing cells, such as tumor cells³⁷. Besides, CuE has been reported to suppress cell invasion and metastasis⁶⁸ and has been proven to provoke no apoptosis in human lymphocytes as compared to prostate adenoma and breast cancer cell lines⁷⁰.

Polyphenols and phytosterols have been widely studied for their neuroprotective properties often mediated by their antioxidant potential^{29, 55, 72}. A variety of molecules such as resveratrol, quercetin and sesamin also exert anti-apoptotic and anti-inflammatory roles in non-mitotic cells, as demonstrated by others and our previous work^{47, 48, 73-75}. Altogether their pro-survival activities on neuronal degeneration might contribute to the developing of new pathway for complementing current therapies for neurodegenerative diseases. To our knowledge, CuE has never been used in a neurodegeneration model of post-mitotic neuronal cells and our results are the first to endorse its neuroprotective properties as well propose original mechanisms for its activity, such as the modulation of cellular macroautophagy.

We performed our experiment in a post-mitotic, DAergic neurons, the NGF-differentiated PC12 cells. This cellular paradigm has been extensively used by us and others to demonstrate that several polyphenols and lignans are indeed neuroprotective by reducing apoptosis and oxidative stress^{48, 55, 76-80}. After NGF administration, PC12 cells adopt a neuronal-like phenotype as manifested by secretion of high levels of dopamine and the expression of TH, DAT, neurofilaments as well as estrogen receptor -alpha and -beta^{28, 81-83}.

Abundant literature reports CuE cytotoxic effects on several tumor cells lines leading to cell-arrest of mitotic cells ^{37, 40, 42}. In a post-mitotic model, CuE directly administered in the culture medium of neuronal cells at a low dose, 10^{-10} M, could reveal important neuroprotective properties, as shown by its ability to rescue MPP⁺-induced cell death, by both LDH release in the medium and DNA denaturation assay. This is not the first time that phytochemicals show apparent paradoxical effects ^{47, 76}. It is reasonable to speculate that CuE at low doses may be involved in activating adaptive responses in post-mitotic cellular model. Literature reports pro-survival antioxidant properties of polyphenols and phytosterols. Following this line of evidence, we performed oxidative stress assays in our DAergic cellular model to help pinpoint the mechanism of CuE-mediated neuroprotection. In our cellular paradigm, 10^{-10} M CuE does not possess any significant antioxidant effect, as shown by both DHR oxidization assay and superoxide anion fluorescence (MitoSoxTM assay). A similar intriguing result has been confirmed with Cucurbitacin B and Cucurbitacin I in a recent study on a tumor model, linking ROS production with autophagy induction in cucurbitacin-treated cells ⁸⁴.

The autophagy-lysosome pathway is currently perceived as a target for neurodegeneration therapies ^{11, 20, 85} as autophagy impairment are observed in several syndromes of neurodegeneration such as PD ^{9, 86, 87}. Thus, re-establishment of impaired autophagy or enhancement of autophagosome degradation might be one of the cellular pathways targeted for neuroprotective strategies. On the other hand, autophagy activation has been shown to be detrimental in other models of neuronal loss such as following a stroke ^{88, 89}. Therefore, while autophagy activation can promote survival when the accumulation of damaged cellular components is the primary issue, autophagy trigger can have detrimental consequences for neurons.

In this context, it is noteworthy that the neuroprotective effects of CuE in a neuronal model of MPP⁺-induced cell death are associated with a decrease in autophagy. In fact, both the decrease in LC3-positive autophagosomes and the accumulation of p62 are consistent with a decrease in autophagy initiation and possibly impaired lysosomal degradation of autophagosomes, since bafilomycin failed to recover their levels. On the other hand, CuE increased the presence of large autophagic vacuoles ($> 1\mu\text{m}$) and rescued lysosomal distribution in MPP⁺ treated cells, suggesting that the decrease in

lysosomal delivery of autophagosomes caused by CuE, could rescue some aspects of lysosomal function. As lysosomes play an important role in neurons⁹⁰, this could explain, at least in part, the neuroprotective role of CuE

In dynamic mitotic cell lines, such as tumor cells, CuE has been reported to act on the remodeling of actin filaments leading to the formation of actin clusters^{42, 44}. However, as we demonstrate in this study, CuE used at 10^{-10} M in a post mitotic model, does not affect actin polymerisation as by confocal observation of CuE neurofilament M filaments structure. It is however difficult to conclude that CuE does not alter the cellular cytoskeleton since other studies reporting CuE-induced cytoskeletal changes have used higher doses of CuE in different cellular system^{42, 44}. In addition, MPP⁺ may impairs microtubules dynamics, as recently reported^{91, 92}. Our results do not exclude that the neuroprotective effects of CuE may be related to its possible stabilizing action on cytoskeleton. Thus other studies should be performed to investigate the role of CuE in the presence of MPP⁺ on cytoskeletal proteins.

In conclusion, autophagy regulation as a means of neuroprotection is rather promising, though it is important to consider its “ying-yang” role. Indeed, as much as the recycling of toxic organelles and proteins might benefit for the cell, too much autophagy may also result in autophagic cell death⁹³⁻⁹⁴. Therefore, the use of molecules targeting the autophagic pathways will require important fine-tuning of dosages. Our data revealing a modulation of the autophagy pathways when using low doses of CuE and a particular role on lysosomal function, propose that this terpenoid molecule could have powerful roles in the cellular dynamic underlying neurodegeneration and neuroprotection.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) accorded to MGM, A-M. A-D. is a C.E.U. student fellow. P.H. thanks for financial support the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic, project no. CZ.1.07/2.3.00/30.0061.

References

1. Butterfield DA, Kanski J. Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mech Ageing Dev* 2001; 122(9):945-62.
2. Schapira AH, Gegg M. Mitochondrial contribution to Parkinson's disease pathogenesis. *Parkinsons Dis* 2011; 2011:159160.
3. Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 2012:428010.
4. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003; 39(6):889-909.
5. Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP Jr. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci* 2006; 226(19):5256-5264.
6. Schapira AH, Jenner P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2011; 26(6), 1049-55.
7. Narkiewicz J, Giachin G, Legname G. In vitro aggregation assays for the characterization of α -synuclein prion-like properties. *Prion*. 2014 Feb 19;8(1).
8. Rubinsztein DC, DiFiglia M, Heintz N, Nixon RA, Qin Z-H, Ravikumar B, et al. Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy* 2005; 1(1):11-22.
9. Boland B, Nixon RA. Neuronal macroautophagy: from development to degeneration. *Mol Aspects Med* 2006; 27:503-19.
10. Butler D, Nixon RA, Bahr BA. Potential compensatory responses through autophagic/lysosomal pathways in neurodegenerative diseases. *Autophagy* 2006; 2(3):234-7.
11. Banerjee R, Beal MF, Thomas B. Autophagy in neurodegenerative disorders: pathogenic roles and therapeutic implications. *Trends Neurosci* 2010; 33(12):541-49.
12. Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 2008; 27(2):433-46.
13. Muñoz P, Huenchuguala S, Paris I, Segura-Aguilar J. Dopamine oxidation and autophagy. *Parkinsons Dis* 2012; 2012:920953.
14. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. α -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.
15. Krebiehl G, Ruckerbauer S, Burbulla LF, Kieper N, Maurer B, Waak J, et al. Reduced basal autophagy and impaired mitochondrial dynamics due to loss of Parkinson's disease-associated protein DJ-1. *PLoS One* 2010; 5(2):e9367.

16. Alvarez-Erviti L, Rodriguez-Oroz MC, Cooper JM, Caballero C, Ferrer I, Obeso JA, et al. Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson's disease brains. *Arch Neurol* 2010; 67(12):1464-72.
17. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 2008; 183(5):795-803.
18. Irrcher I, Aleyasin H, Seifert EL, Hewitt SJ, Chhabra S, Phillips M, Lutz AK, Rousseaux MW, Bevilacqua L, Jahani-Asl A, Callaghan S, MacLaurin JG, Winklhofer KF, Rizzu P, Rippstein P, Kim RH, Chen CX, Fon EA, Slack RS, Harper ME, McBride HM, Mak TW, Park DS. Loss of the Parkinson's disease-linked gene DJ-1 perturbs mitochondrial dynamics. *Hum Mol Genet*. 2010 Oct 1;19(19):3734-46.
19. Lee JY, Nagano Y, Taylor JP, Kin KL, Yao TP. Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy. *J Cell Biol* 2010; 189(4):671-9.
20. Son JH, Shim JH, Kim KH, Ha JY, Han JY. Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med* 2012; 44(2):89-98.
21. Segura Aguilar, J. and R.M. Kostrzewa, Neurotoxins and neurotoxic species implicated in neurodegeneration. *Neurotox Res*, 2004. 6(7-8): p. 615-30.
22. Zuo L, Motherwell MS. The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease. *Gene*. 2013 Dec 10;532(1):18-23.
23. Blanchet J, Longpré F, Bureau G, Morissette M, DiPaolo T, Bronchti G, et al. Resveratrol, a red wine polyphenol, protects dopaminergic neurons in MPTP-treated mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008; 32(5):1243-50.
24. Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:845618.
25. Annese V, Herrero MT, Di Pentima M, Gomez A, Lombardi L, Ros CM, De Pablos V, Fernandez-Villalba E, De Stefano ME. Metalloproteinase-9 contributes to inflammatory glia activation and nigro-striatal pathway degeneration in both mouse and monkey models of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced Parkinsonism. *Brain Struct Funct*. 2014 Feb 21.
26. Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* 2004; 318(1):215-24.
27. Przedborski S, Tieu K, Perier C, Vila M. MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr* 2004; 36(4):375-9.
28. Gélinas S, Martinoli MG. Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP+-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells. *J Neurosci Res* 2002; 70(1):90-96.

29. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2009; 2(5):270-8
30. Iriti M, Vitalini S, Fico G, Faoro F. Neuroprotective herbs and foods from different traditional medicines and diets. *Molecules* 2010; 15(5):3517-55.
31. Kelsey NA, Wilkins HM, Linseman DA. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Molecules*. 2010 Nov 3;15(11):7792-814.
32. Campos HC, da Rocha MD, Viegas FP, Nicastro PC, Fossaluzza PC, Fraga CA, Barreiro EJ, Viegas C Jr. The role of natural products in the discovery of new drug candidates for the treatment of neurodegenerative disorders I: Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2011 Mar;10(2):239-50.
33. Small BJ, Rawson SK, Martin C, Eisel SL, Sanberg SD, McEvoy CL, Sanberg PR, Shytle RD, Tan J, Bickford PC. Nutraceutical Intervention Improves Older Adults' Cognitive Functioning. *Rej. Res.* 2014; 17 (1):27-32.
34. Seidl SE, Santiago JA, Bilyk H, Potashkin JA. The emerging role of nutrition in Parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neurosci.* 2014; 6. Article36 :1-13
35. Stefani M, Rigacci S. Beneficial properties of natural phenols: Highlight on protection against pathological conditions associated with amyloid aggregation. *Biofactors*. 2014 Jun 3. doi: 10.1002/biof.1171.
36. Tannin-Spitz T, Bergman M, Grossman S. Cucurbitacin glucosides: antioxidant and free-radical scavenging activities. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 364(1):181-6.
37. Sun J, Blaskovich MA, Jove R, Livingston SK, Coppola D, Sebt SM. Cucurbitacin Q: a selective STAT3 activation inhibitor with potent antitumor activity. *Oncogene* 2005; 24(20):3236-45.
38. Abdelwahab SI, Hassan LE, Sirat HM, Yagi SM, Koko WS, Mohan S, et al. Anti-inflammatory activities of Cucurbitacin E isolated from *Citrullus lanatus* var. *citroides*: role of reactive nitrogen species and cyclooxygenase enzyme inhibition. *Fitoterapia* 2011; 82(8):1190-7.
39. Jayaprakasam B, Seeram NP, Nair MG. Anticancer and anti-inflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. *Cancer Lett* 2003; 189(1):11-16.
40. Huang WW, Yang JS, Lin MW, Chen PY, Chiou SM, Chueh FS, et al. Cucurbitacin E induces G₂/M phase arrest through STAT3/p53/p21 signaling and provokes apoptosis via Fas/CD95 and mitochondria-dependent pathways in human bladder cancer T24 cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012:952762.
41. Attard E, Cuschieri A. Cytotoxicity of Cucurbitacin E extracted from *Ecballium elaterium* and anticancer agents *in vitro*. *Journal of Natural Remedies* 2004; 4(2).
42. Sörensen PM, Iacob RE, Fritzsche M, Engen JR, Briehar WM, Charras G, et al. The natural product cucurbitacin E inhibits depolymerisation of actin filaments. *ACS Chem Biol* 2012; 7(9):1502-8.

43. Attard E, Cuschieri A, Brincat MP. Morphological effects induced by cucurbitacin E on ovarian cancer cells *in vitro*. Journal of Natural Remedies 2005; 5(1).
44. Duncan KL, Duncan MD, Alley MC, Sausville EA. Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells. Biochem Pharmacol 1996; 52(10): 1553-60.
45. Momma K, Masuzawa Y, Nakai N, Chujo M, Murakami A, Kioka N, et al. Direct interaction of Cucurbitacin E isolated from *Alsomitra macrocarpa* to actin filament. Cytotechnology 2008; 56(1):33-39.
46. Attard E. (2002) Rapid Detection of Cucurbitacins in Tissues and *in vitro* Cultures of *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. CGC Reports. 25 : 71-75.
47. Bournival J, Francoeur MA, Renaud J, Martinoli MG. Quercetin and sesamin protect neuronal PC12 cells from high-glucose-induced oxidation, nitrosative stress and apoptosis. Rej Res 2012; 15(3), 322-333.
48. 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. Cell Mol Neurobiol 2009; 29(8):1169-80.
49. Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, Tashiro Y. Bafilomycin A₁ prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. Cell Struct Funct 1998; 23: 33-42.
50. Ganley IG, Wong PM, Gammoh N, Jiang X. Distinct autophagosomal-lysosomal fusion mechanism revealed by thapsigargin-induced autophagy arrest. Mol Cell 2011; June 24;42(6):731-43.
51. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy FEBS Lett. 2010 April 2; 584(7): 1287–1295.
52. Haslam G., Wyatt D., Kitos PA (1998) Estimating the number of viable animal cells in multi-well culture based on their lactate dehydrogenase activities" Cytotechnology 32:63-75.
53. Bournival J, Plouffe M, Renaud J, Provencher C, Martinoli MG. **B.** Quercetin and sesamin protect dopaminergic cells from MPP⁺-induced neuroinflammation in a microglial (N9)-neuronal (PC12) coculture system. Oxid Med Longev 2012; 2012:921941.
54. Frankfurt OS, Krishan A. Identification of apoptotic cells by formamide-induced DNA denaturation in condensed chromatin. J Histochem Cytochem 2001; 49(3):369-78.
55. Carange J, Longpré F, Daoust B, Martinoli MG. 24-Epibrassinolide, a phytosterol from the brassinosteroid family, protects dopaminergic cells against MPP⁺-induced oxidative stress and apoptosis. J Toxicol 2011; 39:2859.

56. Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med* 2007; 43(7):995-1022.
57. Wrona M, Patel K, Wardman P. Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med* 2005; 38(2):262-70.
58. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol.* 2008; 445:77-88. doi: 10.1007/978-1-59745-157-4_4.
59. Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy.* 2007; Nov-Dec;3(6):542-5.
60. Lin C, Tsai S-H, Tseng MT, Peng S-F, Kuo C-S, Lin M-W, Hsu Y-M, Lee M-R, Amagaya S, Huang W-W, Wu T-S, Yang J-S. AKT serine/threonine protein kinase modulates baicalin-triggered autophagy in human bladder cancer T24 cells. *Int J Oncol.* 2013; 42(3):993-1000.
61. Arduino DM, Esteves A.R., Cortes L., Silva D.F., Patel B, Grazina M, Swerdlow S.H. Oliveira R.S. and Cardoso S.M. Mitochondrial metabolism in Parkinson's disease impairs quality control autophagy by hampering microtubule-dependent traffic. *Hum Mol Genetics*, 2012; 21(21): 4680-4702.
62. [Bugaut H](#), [Bruchard M](#), [Berger H](#), [Derangère V](#), [Odoul L](#), [Euvrard R](#), [Ladoire S](#), [Chalmin F](#), [Végran F](#), [Rébé C](#), [Apetoh L](#), [Ghiringhelli F](#), [Mignot C](#). Bleomycin Exerts Ambivalent Antitumor Immune Effect by Triggering Both Immunogenic Cell Death and Proliferation of Regulatory T Cells *PLoS One.* 2013; 8(6): e65181.
63. Oeste CL, Seco E, Patton WF, Boya P, Pérez-Sala D. Interactions between autophagic and endo-lysosomal markers in endothelial cells. *Histochem Cell Biol.* 2013; 139(5):659-70.
64. Zhou C, Huang Y, Przedborski S. Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann N Y Acad Sci* 2008 1147:93-104.
65. Pérez-De La Cruz V, Elinios-Calderón D, Carrillo-Mora P, Silva-Adava D, Konigsberg M, Morán J, Ali SF, Chánez-Cárdenas ME, Pérez-De La Cruz G, Santamariá A. Time-course correlation of early toxic events in three models of striatal damage: modulation by proteases inhibition. *Neurochem Int* 2010; 56:834-42.
66. Dehay B, Bové J, Rodríguez-Muela N, Perier C, Recasens A, Boya P, Vila M. Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2010; Sep 15;30(37):12535-44.
67. [Köchl R](#), [Hu XW](#), [Chan EY](#), [Tooze SA](#). [Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes.](#) *Traffic.* 2006;7(2):129-45.

68. Zhang T, Li J, Dong Y, Zhai D, Lai L, Dai F, et al. **B.** Cucurbitacin E inhibits breast tumor metastasis by suppressing cell migration and invasion. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 135(2):445-58.
69. Hsu YC, Chen MJ, Huang TY. Inducement of mitosis delay by cucurbitacin E, a novel tetracyclic triterpene from climbing stem of *Cucumis melo* L., through GADD45 γ in human brain malignant glioma (GBM) 8401 cells. *Cell Death Dis.* 2014 Feb 27;5:e1087. doi: 10.1038/cddis.2014.22.
70. Attard EA, Scicluna-Spiteri M, Brincat MP, Cuschieri A. The effects of Cucurbitacin E on the proliferation of prostate and breast cancer cell lines, and peripheral T-lymphocytes. *Maltese Fourth Med. School Conf.* 1999; R034:145
71. Qiao J, Xu LH, He J, Ouyang DY, He XH. Cucurbitacin E exhibits anti-inflammatory effect in RAW 264.7 cells via suppression of NF- κ B nuclear translocation. *Inflamm Res.* 2013 May;62(5):461-9.
72. Pietrocola F, Mariño G, Lissa D, Vacchelli E, Malik S.A, Niso-Santano M, Zamzami N, Galluzzi L, Maiuri M-C, and Kroemer G, Pro-autophagic polyphenols reduce the acetylation of cytoplasmic proteins. *Cell Cycle* 11:20, 3851–3860; October 15, 2012.
73. Bureau G, Longpré F, Martinoli MG. Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death by neuroinflammation. *J Neurosci Res* 2008; 86(2):403-10.
74. Choi DK, Koppula S, Suk K. Inhibitors of microglial neurotoxicity: focus on natural products. *Molecules.* 2011 Jan 25;16(2):1021-43.
75. Foti Cuzzola V, Ciurleo R, Giacoppo S, Marino S, Bramanti P. Role of resveratrol and its analogues in the treatment of neurodegenerative diseases: focus on recent discoveries. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2011 Nov;10(7):849-62.
76. Lahaie-Collins V, Bournival J, Plouffe M, Carange J, Martinoli MG, Sesamin modulate tyrosine hydroxylase, superoxide dismutase, catalase, inducible NO synthase and interleukin-6 expression in dopaminergic cells under MPP⁺-induced oxidative stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2008; 1(1): 54-62.
77. Hamada N, Fujita Y, Tanaka A, Naoi M, Nozawa Y, Ono Y, Kitagawa Y, Tomimori N, Kiso Y, Ito M. Metabolites of sesamin, a major lignan in sesame seeds, induce neuronal differentiation in PC12 cells through activation of ERK1/2 signaling pathway. *J Neural Transm.* 2009 Jul;116(7):841-52.
78. Blasina MF, Vaamonde L, Morquio A, Echeverry C, Arredondo F, Dajas F. Differentiation induced by *Achyrocline satureioides* (Lam) infusion in PC12 cells. *Phytother Res.* 2009 Sep;23(9):1263-9.
79. El Omri A, Han J, Yamada P, Kawada K, Ben Abdrabbah M, Isoda H. *Rosmarinus officinalis* polyphenols activate cholinergic activities in PC12 cells through phosphorylation of ERK1/2. *J Ethnopharmacol.* 2010 Sep 15;131(2):451-8.

80. 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.
81. Kadota T, Yamaai T, Saito Y, Akita Y, Kawashima S, Moroi K, Inagaki N, Kadota N. Expression of dopamine transporter at the tips of growing neurites of PC12 cells. *The Journal histochem cytochem*, 1996; 44 (9): 989-996.
82. Nilsen J, Mor G, Naftolin F. Raloxifene induces neurite outgrowth in estrogen receptor positive PC12 cells. *Menopause* 1998; 5 (4): 211-216.
83. Chiasson K, Lahaie-Collins ., Bournival J, Delapierre B, Gélinas S, Martinoli MG Oxidative stress and 17alpha and 17 beta estradiol modulate neurofilaments differently. *J. Mol. Neurosci.*2006; 30: 297-309.
84. Zhang T, Li Y, Park KA, Byun HS, Won M, Jeon J, et al. A. Cucurbitacin induces autophagy through mitochondrial ROS production which counteracts to limit caspase-dependent apoptosis. *Autophagy* 2012; 8(4):559-76.
85. Yang F, Yang YP, Mao CJ, Cao BY, Cai ZL, Shi JJ, et al. Role of autophagy and proteasome degradation pathways in apoptosis of PC12 cells overexpressing human alpha-synuclein. *Neurosci Lett* 2009; 454(3):203-8.
86. Pan T, Kondo S, Le W, Jankovic J. The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *Brain* 2008; 131(8):1969-78.
87. Xilouri M, Brekk OR, Kirik D, Stefanis L. LAMP2A as a therapeutic target in Parkinson disease. *Autophagy*. 2013 Dec;9(12):2166-8.
88. Gao L, Jiang T, Guo J, Liu Y, Cui G, Gu L, Su L, Zhang Y Inhibition of Autophagy Contributes to Ischemic Postconditioning-Induced Neuroprotection against Focal Cerebral Ischemia in Rats. *PloS one* 7: e46092 2012.
89. Xu F, Li J, Ni W, Shen YW, Zhang XP. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist 15d-prostaglandin J2 mediates neuronal autophagy after cerebral ischemia-reperfusion injury. *PLoS One*. 2013;8(1):e55080.
90. Appelqvist H, Waster P, Kagedal K, Ollinger K The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *Jour. Mol Cell Biol* 5 (4): 214-226.
91. Cartelli D, Ronchi C, Maggioni MG, Rodighiero S, Giavini E, Cappelletti G . Microtubule dysfunction precede transport impairment and mitochondria damage in MPP+ -induced neurodegeneration *J. Neurochem.* 2010, 115 (1): 247-258.
92. Cardoso SM, Esteves AR, Arduino DM Mitochondrial metabolic control of microtubule dynamics impairs the autophagic pathway in Parkinson's disease. *Neurodegener Dis* 2012, 10 (1-4):38-40.
93. Demers-Lamarche J, Grondin M, Nguyen AP, Germain M. LKB1-regulated adaptive mechanisms are essential for clearance of protein aggregates and neuronal survival following mitochondrial dysfunction. 5th Canadian association for neuroscience meeting, poster no. 2-C-75, Montreal, Canada, May 25-28, 2014

94. Germain M and Slack RS. Dining in with BCL-2: new guests at the autophagy table. Clin Sci (Lond). 2009 Oct 26;118(3):173-81.

Legends to the figures

Figure 1. **A.** Immunofluorescence picture revealing the neuronal phenotype of PC12 cells after 5 days of NGF treatment. TH: tyrosine hydroxylase, as marker of dopamine; NFL: neurofilament-low-chain, as a marker of neuronal cytoskeleton. Nuclei were counterstained with DAPI. **B.** Experimental set-up. CuE 10^{-10} M was administered 3-hour before MPP⁺ or DDC or Bafilomycin (Baf) or Rapamycin (Rap) treatment. CuE was administered once more 15 min after MPP⁺ or DDC or Baf or Rap.

Figure 2. Dose-response studies. Cells were pre-treated with CuE concentrations ranging from 10^{-6} to 10^{-10} M for 3 h and then exposed to 5 mM MPP⁺. Cytotoxicity was measured using the colorimetric LDH release assay. The absorbance value obtained for the untreated control was subtracted from all other values, as described in Material and Methods. Administration of CuE alone did not induce significant cellular death (data not shown). Values are the average of 6 samples from 4 independent experiments for a total of 24 measurements. Data are expressed as means \pm S.E.M. $n=4$. *** $P < .001$ versus Ctrl and $^{\circ\circ\circ} P < .001$ versus MPP⁺.

Figure 3. **A:** Effects of CuE on cytotoxicity induced by MPP⁺ in neuronal PC12 cells, as measured by colorimetric LDH release assay. Cells were pre-treated for 3 hours with vehicle or CuE 10^{-10} M, followed by a 24-hour treatment with or without MPP⁺ (5 mM). The absorbance value obtained for the untreated control was subtracted from all other values, as described in Material and Methods. MPP⁺ treatment shows an important enhancement of cellular death, compared to control condition. Administration of CuE powerfully rescues MPP⁺-induced cellular death. Values are the average of 6 samples from 4 independent experiments for a total of 24 measurements. Data are expressed as means \pm S.E.M. $n=4$. *** $P < .001$ versus Ctrl and $^{\circ\circ} P < .01$ versus MPP⁺. **B:** Detection of specific DNA denaturation in apoptotic cells using monoclonal antibodies against single-stranded DNA. Neuronal PC12 cells treated with MPP⁺ alone show a significant increase in apoptosis compared to control (Ctrl). Administration of CuE prior

to MPP^+ ($\text{CuE} + \text{MPP}^+$) shows a decrease in DNA denaturation compared to MPP^+ alone. Values are the average of 6 samples from 3 independent experiments for a total of 18 measurements. Data are expressed as means \pm S.E.M. $n=4$. ** $P < 0.01$ versus Ctrl and $^{\circ} P < 0.05$ versus MPP^+ .

Figure 4. Rhodamine detection of ROS in neuronal PC12 cells after MPP^+ and/or CuE treatment. Nonfluorescent DHR is converted to fluorescent rhodamine in the presence of several free radical (OH^{\cdot} , NO_2^{\cdot} , $\text{CO}_3^{\cdot-}$, H_2O_2 , HOCl and ONOO^{\cdot}). **A:** fluorescent microscopy. A significant signal is marked in neuronal cells treated with MPP^+ but not in those exposed to CuE or the vehicle (CTRL). Administration of CuE + MPP^+ does not reduce fluorescence significantly compared to MPP^+ alone. Scale bar = 10 μm . **B:** Histogram. Semi-quantitative analysis of rhodamine fluorescence. Data are expressed as relative fluorescence units and are means \pm S.E.M. $n=4$. *** $P < 0.001$ versus Ctrl and n.s. = non-significant.

Figure 5. Selective detection of superoxide anion by MitoSOX Red. This fluorogenic dye enters the cell and is oxidized by $\text{O}_2^{\cdot-}$ to a red fluorescent molecule. DDC, a specific superoxide dismutase inhibitor, was used as a positive control for $\text{O}_2^{\cdot-}$ production and staining. **A:** Fluorescence microphotographs show intense MitoSOX Red signal in DDC exposed cells. CuE does not rescue cells from oxidative stress as $\text{O}_2^{\cdot-}$ levels are equally high in DDC condition with or without CuE pre-treatment. Untreated control and CuE-only condition show similar low fluorescence levels. Nuclei were counterstained with Hoescht 33342. Scale bar = 10 μm . **B:** Histogram. Semi-quantitative measures of MitoSOX Red fluorescence. Data are expressed as relative fluorescence units and are means \pm S.E.M. $n=3$. ** $P < 0.01$ versus Ctrl. n.s. = non significant.

Figure 6. Acridine orange detection of acidic lysosomes. Acridine orange enters acidic compartments such as lysosomes and become protonated and sequestered. **A.** Microphotographs illustrating an intense fluorescence when CuE is administered alone and low of fluorescence in MPP^+ or $\text{CuE} + \text{MPP}^+$ conditions. Nuclei were counterstained in blue with Hoescht 33342. Scale bar = 10 μm . **B.** Histogram, semi-quantitative measures of acridine orange fluorescence. Data are expressed as relative fluorescence units and are means \pm S.E.M. $n=3$. *** $P < 0.001$ versus Ctrl.

Figure 7. Epifluorescence analysis of autophagy in neuronal PC12 cells treated with CuE and/or MPP⁺ using Cyto-ID autophagy detection kit. **A:** Histogram. Total content of vacuoles positive for Cyto-ID. CuE administration could not change the total number of vacuoles while MPP⁺ considerably decreases cellular vacuole content. **B:** Histogram. Number of vacuoles larger-than-1 μ m per cell. Administration of CuE alone clearly induces an increased number of larger-than-1 μ m vacuoles. Administration of MPP⁺ intensely reduces the presence of these large vacuoles. Pre-treatment with CuE before MPP⁺ (CuE + MPP⁺) still show similar levels of large vacuoles as in CuE-alone treatment. **C:** fluorescent microscopy. CuE-treated cells show an increased number of autophagic vacuoles larger than 1 μ m (arrowheads). Positive control for autophagy was rapamycin, a known autophagy inducer. Nuclei were counterstained in blue with Hoechst 33342. Scale bar = 10 μ m. Data are expressed as number of vacuoles larger than 1 μ m per cell and are means \pm S.E.M. $n=3$. ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ versus Ctrl. $\diamond\diamond P < .01$ versus MPP⁺ and n.s. = non-significant.

Figure 8. **A:** Immunofluorescence detection of LC3b in neuronal PC12 cells. Punctate structures stained for LC3b represent specific autophagic vacuoles. Scale bar = 50 μ m. **B:** Histogram. CuE treatment did not increase the total number of LC3b-positive autophagosomes, rather slightly decreased their presence. Bafilomycin (Baf), an induced of autophagy, was used as a positive control. CuE treatment before Baf (Baf + CuE) administration clearly reduced the Baf-induced formation of LC3b positive autophagosomes. Data are expressed as percentage of cellular surface occupied by LC3b vacuoles (area fraction) and are means \pm S.E.M. $n=3$. *** $P < 0.001$ and * $P < 0.05$ versus Ctrl. $\diamond P < 0.05$ versus Baf.

Figure 9. p62 protein expression as revealed by Western blot. CuE significantly increases p62 expression, a cargo protein involved in autophagic flux, Baf induces a strong expression of p62 and the administration of CuE + Baf does not additionally increase p62 protein expression. TH was used to normalise p62. Values are the average of 3 samples from 3 independent experiments for a total of 9 measurements. Data are expressed as means \pm S.E.M. $n=3$. *** $P < .001$ and * $P < 0.05$ versus Ctrl.

Figure 10. Immunofluorescence pictures illustrating lysosome and mitochondria localization. Neuronal cells were double-stained for LAMP2a, a specific lysosomal

marker (green fluorescence) and mtHSP70, a specific mitochondrial marker (red fluorescence). MPP⁺ condition shows delocalisation of lysosomes (green staining and arrowheads) in dense clusters near the nuclei, resulting in a staining pattern dramatically different from the other conditions. Administration of CuE appears to rescue in part normal lysosome localization. Microphotographs are representative of 3 different experiments. Scale bar = 10 μ m.

Figure 11. Immunofluorescence detection of several cytoskeletal proteins in CuE- or vehicle-treated neuronal cells (CTRL). Cells were stained for β actin (red), β 3-tubulin (green) or neurofilament-M (NF-M) (purple). Hoechst 33342 (blue) was used to counterstain all nuclei. CuE treatment for 24 hours does not visibly alter the neuronal cytoskeleton. Microphotographs are representative of 3 different experiments. Scale bar = 10 μ m.

Figures

Figure 1

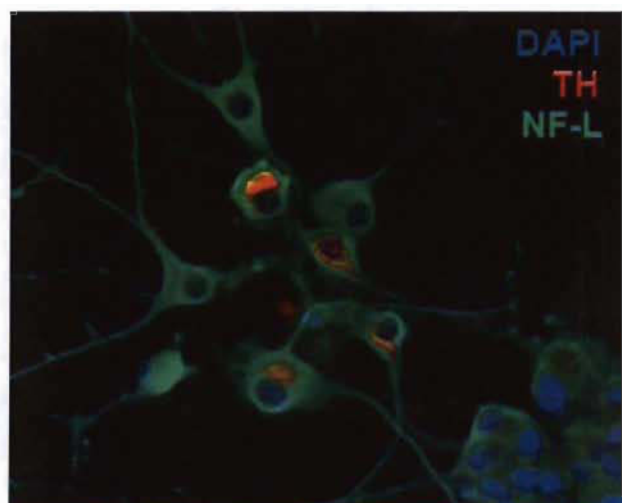
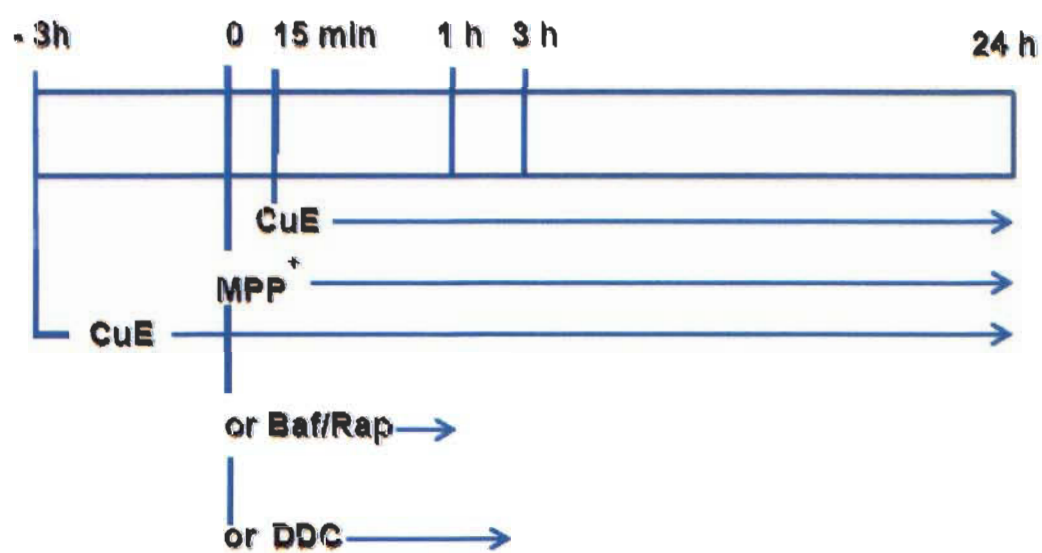
A**B**

Figure 2

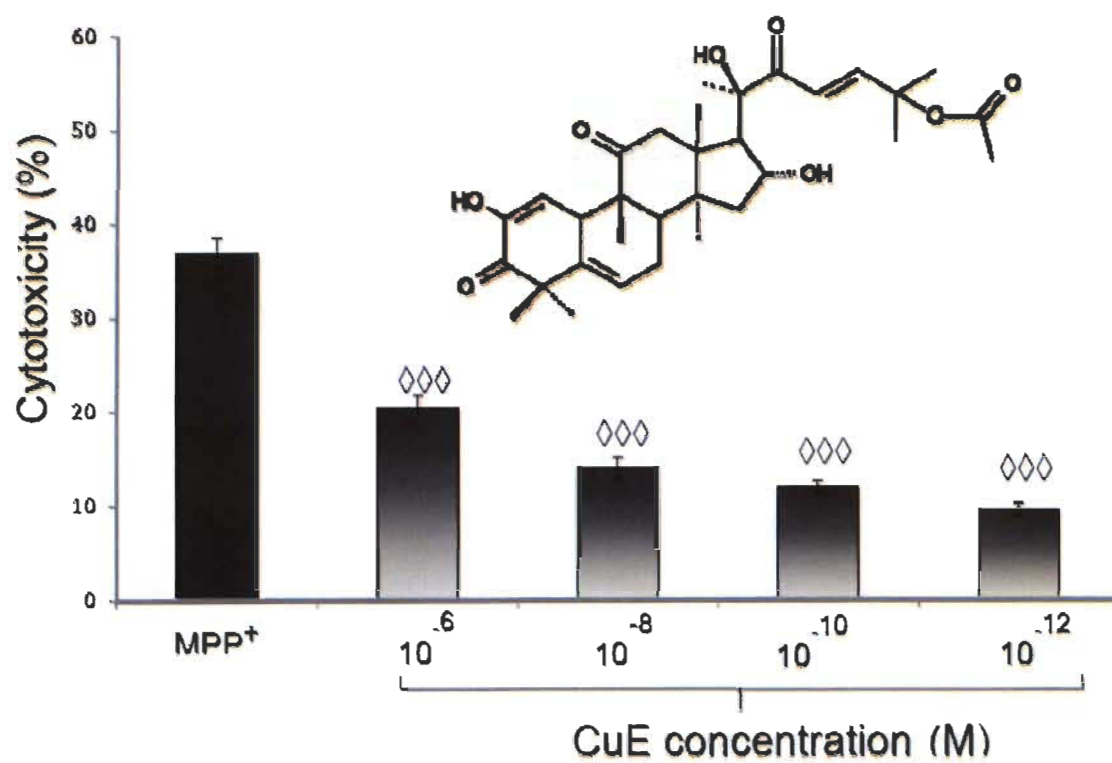


Figure 3

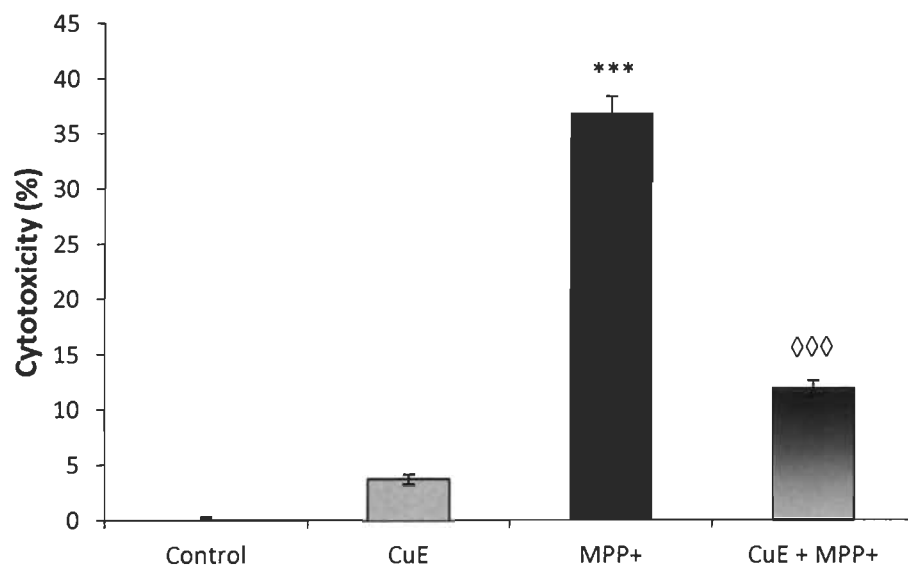
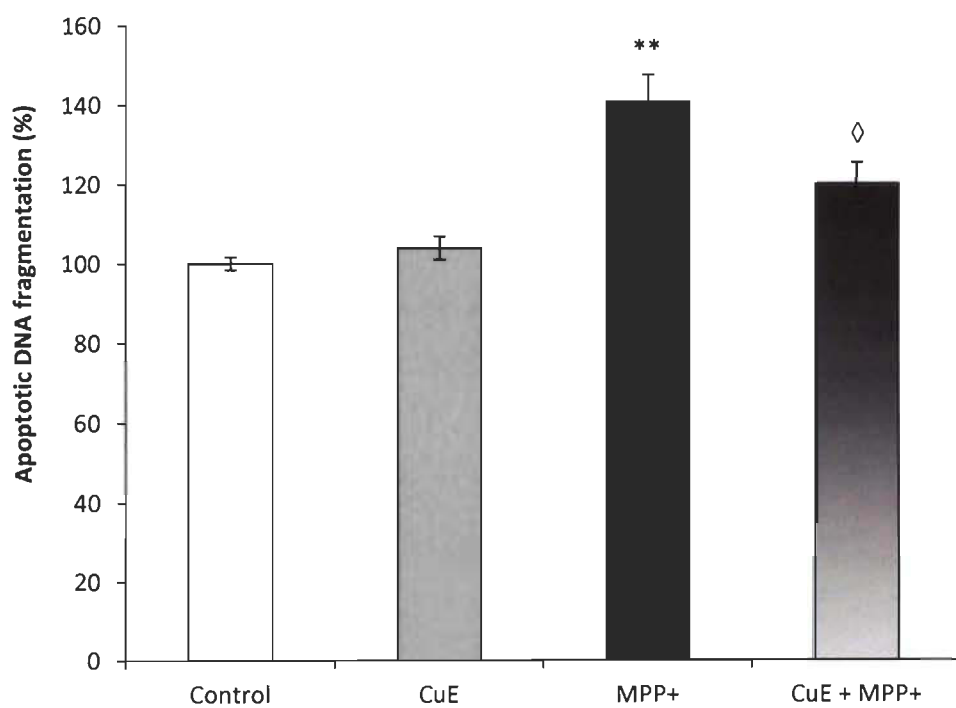
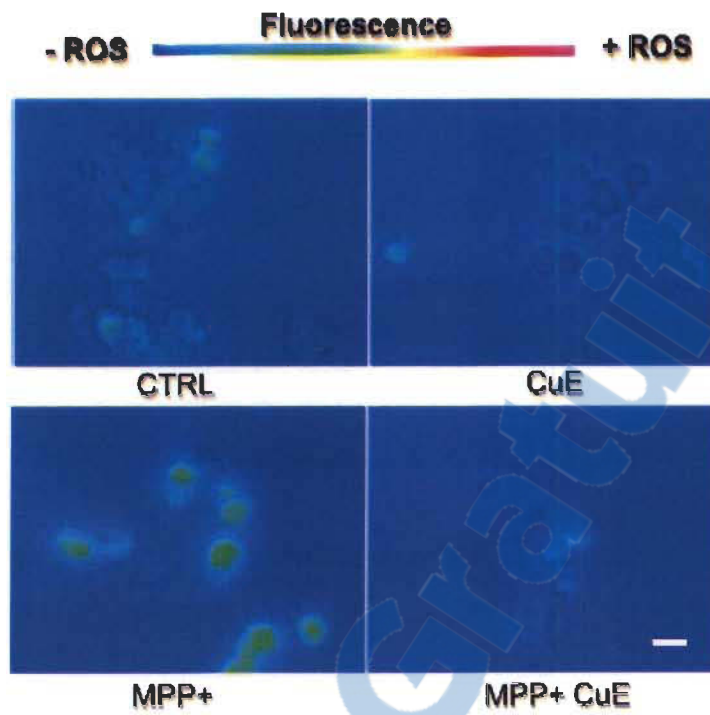
A**B**

Figure 4

A



B

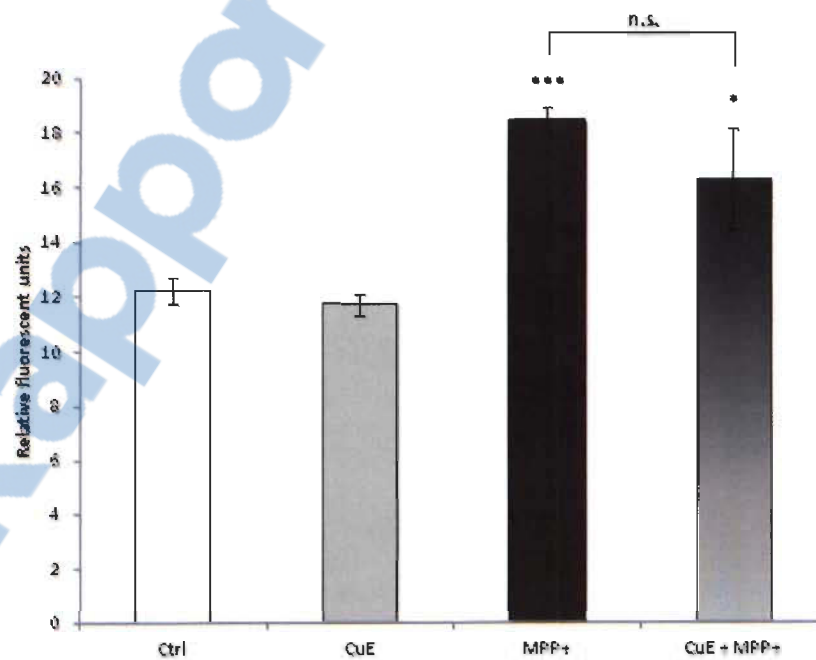
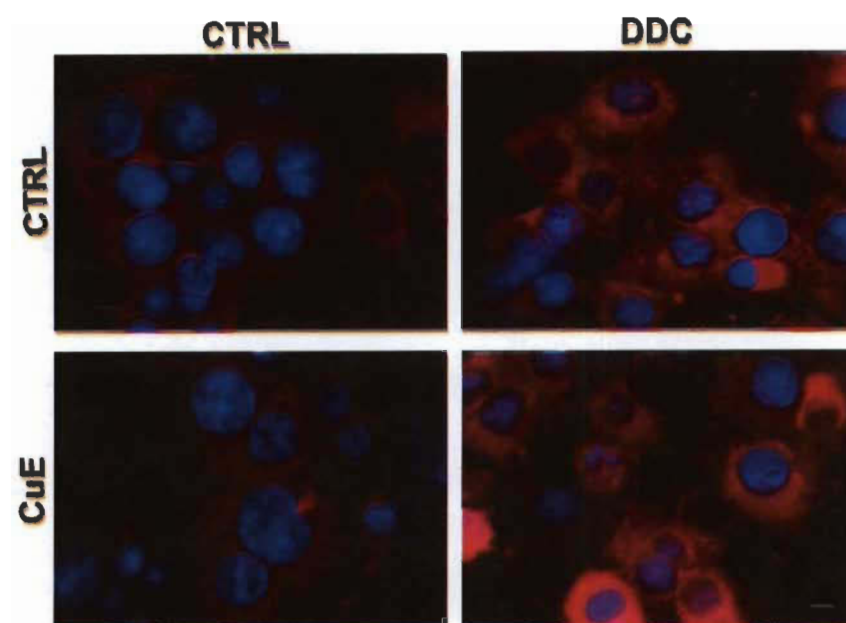


Figure 5

A



B

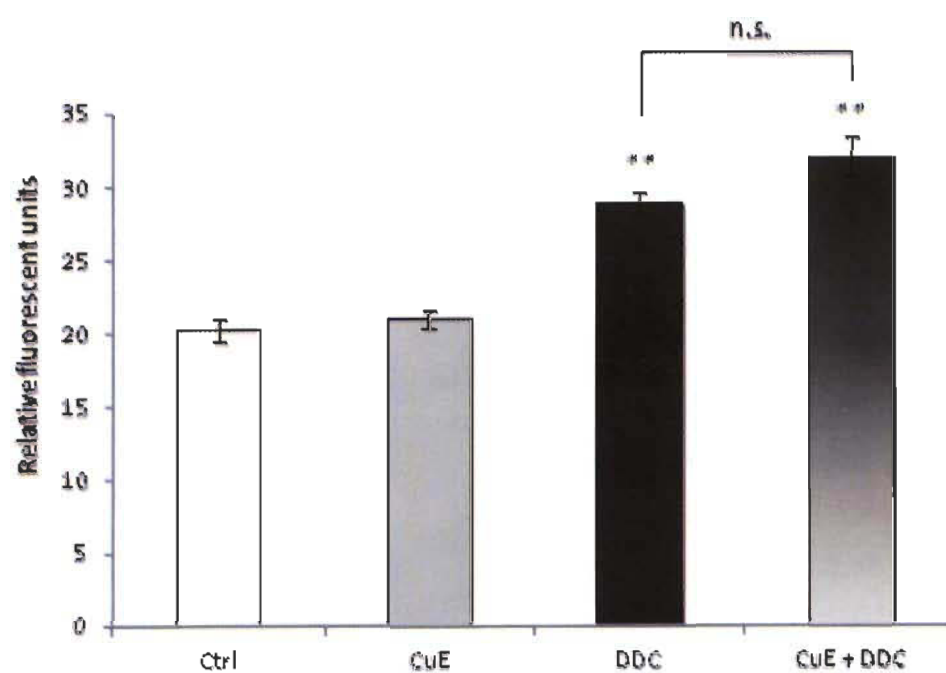
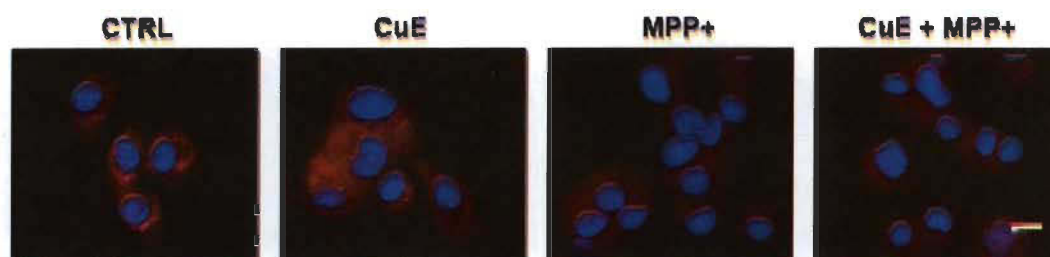


Figure 6

A



B

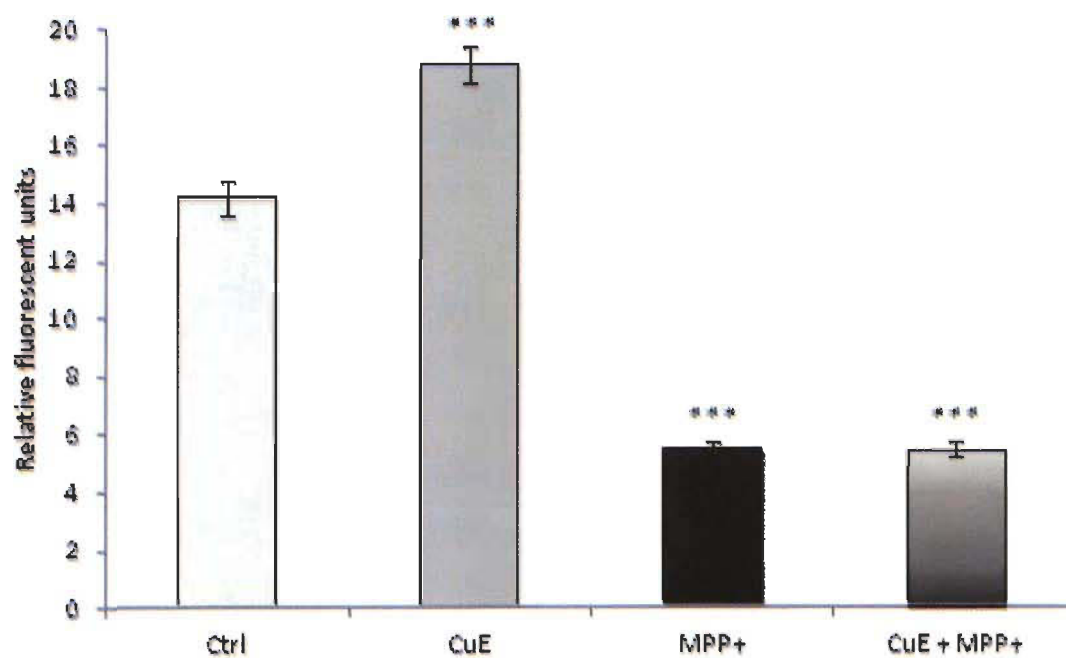


Figure 7

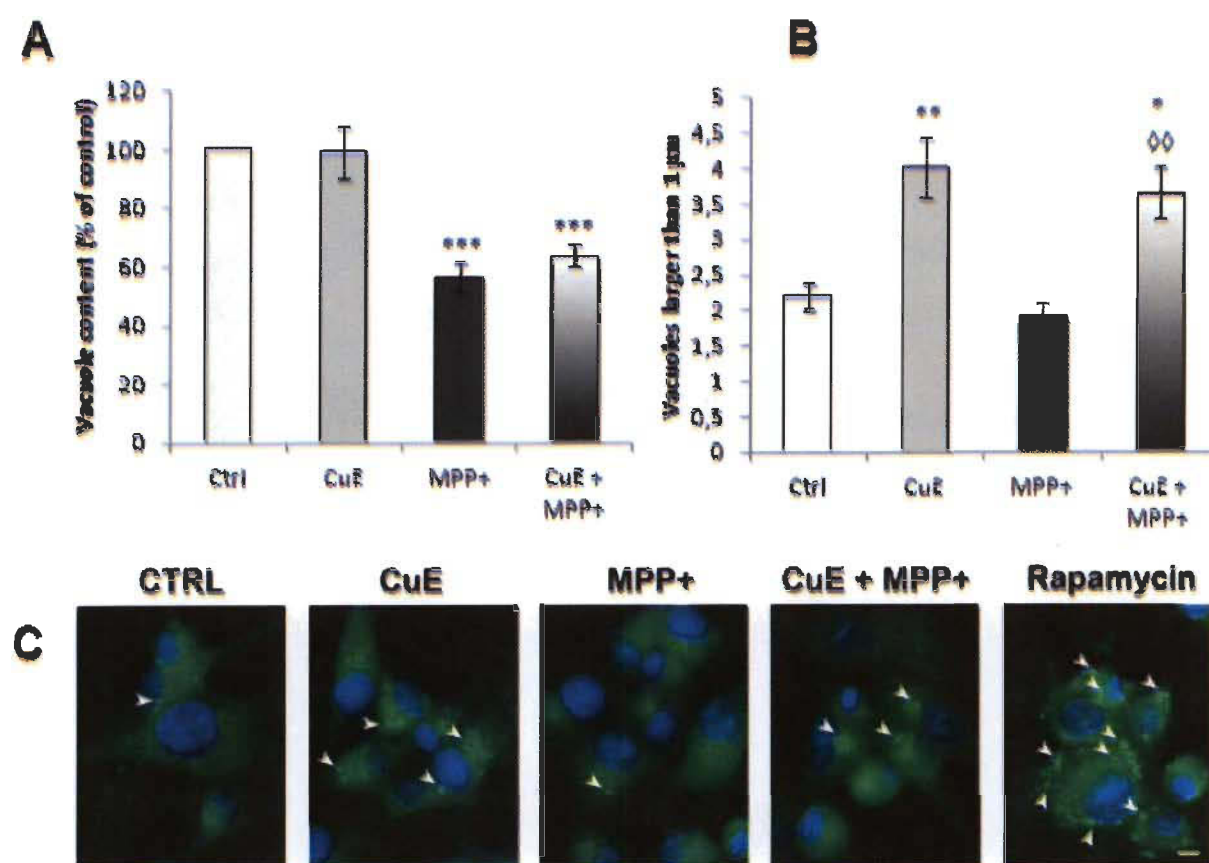
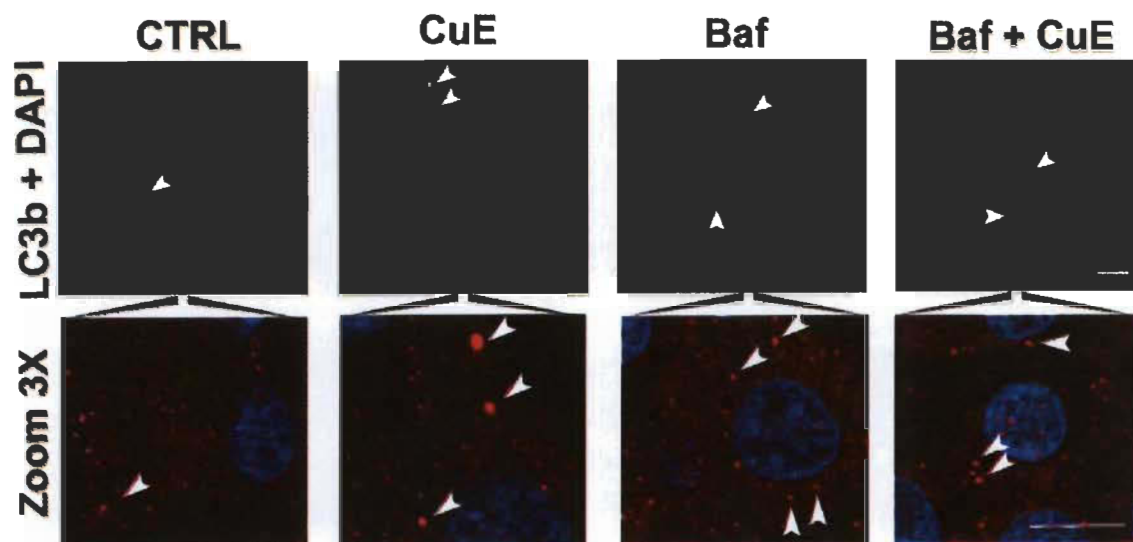


Figure 8

A



B

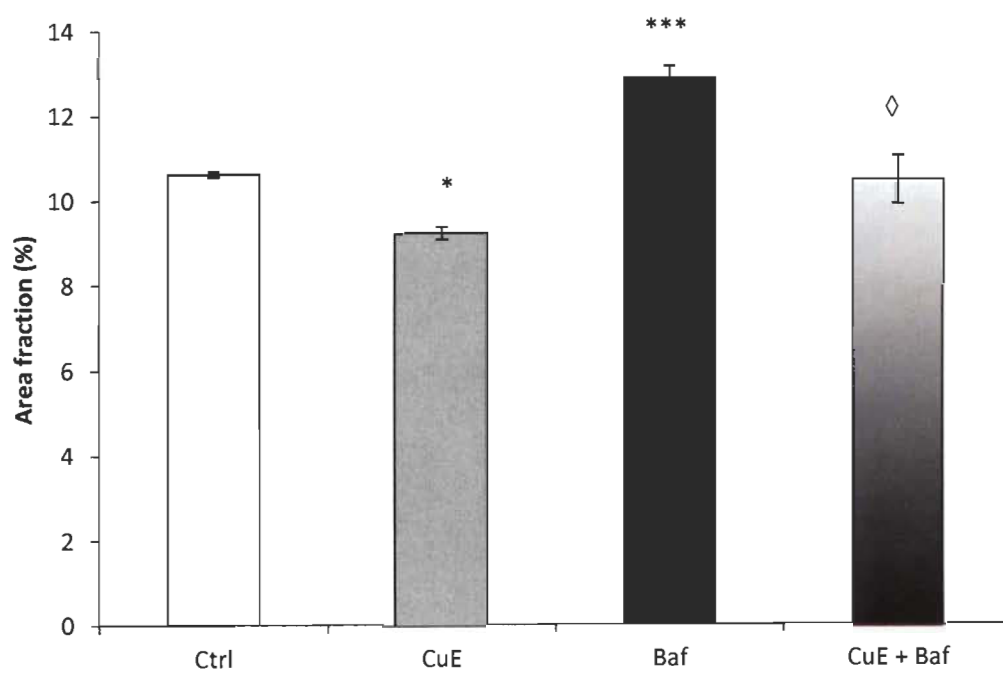


Figure 9

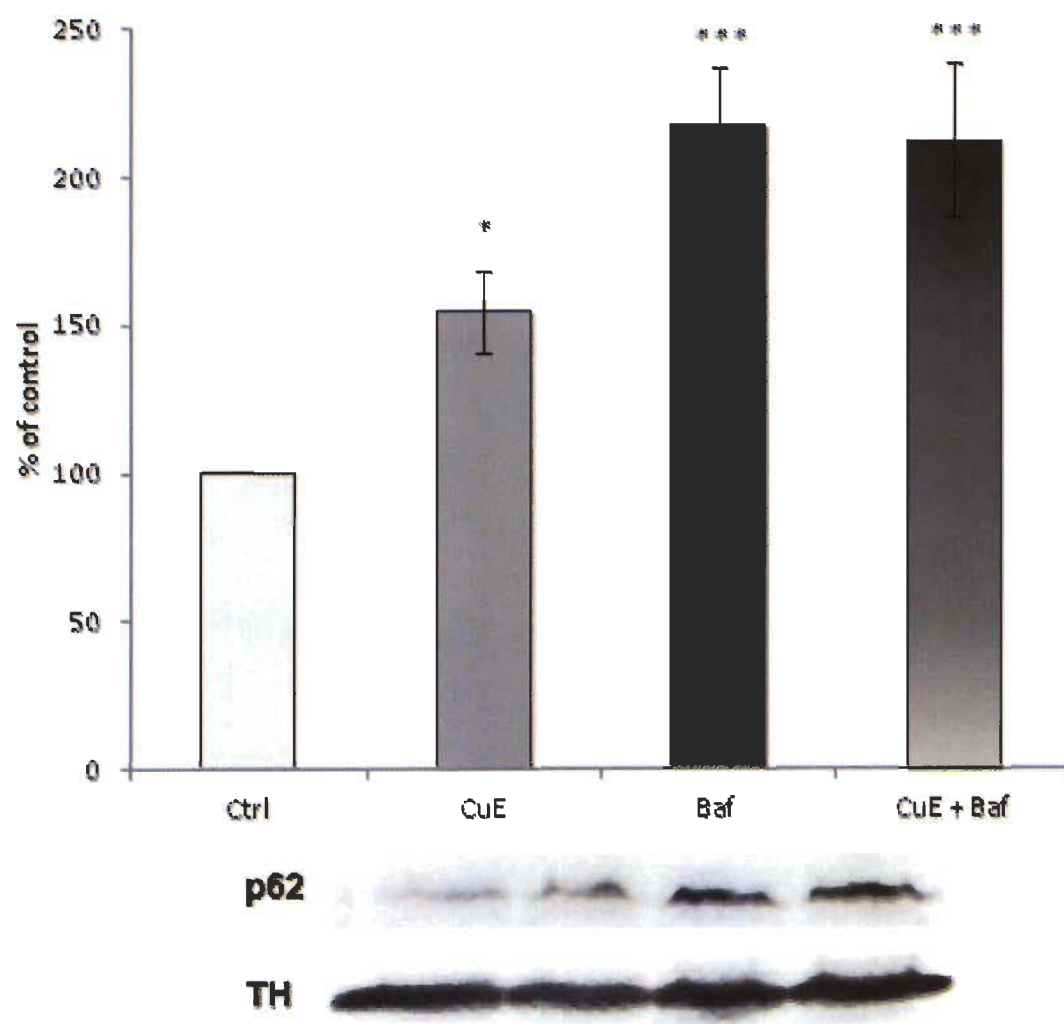


Figure 10

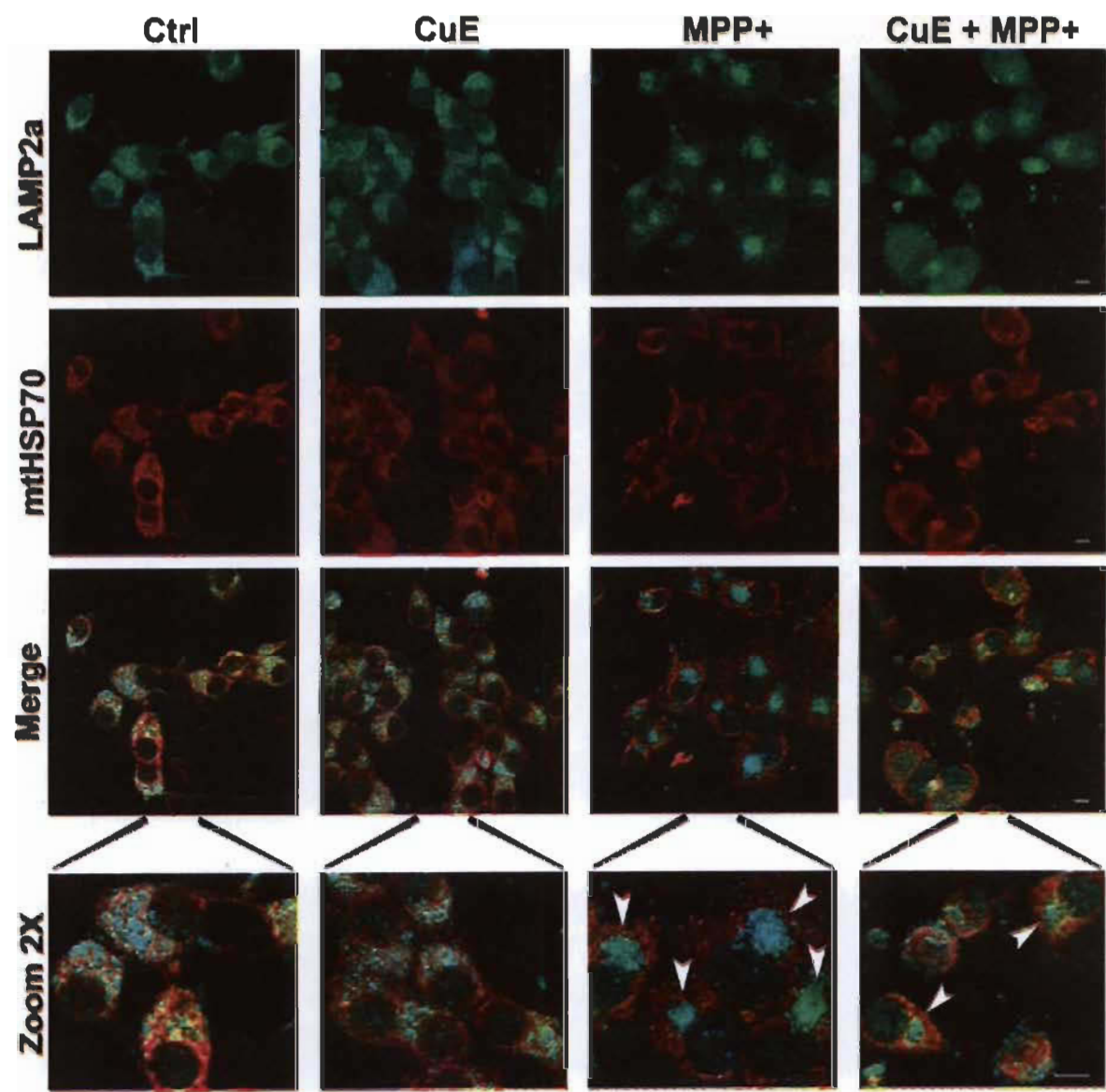
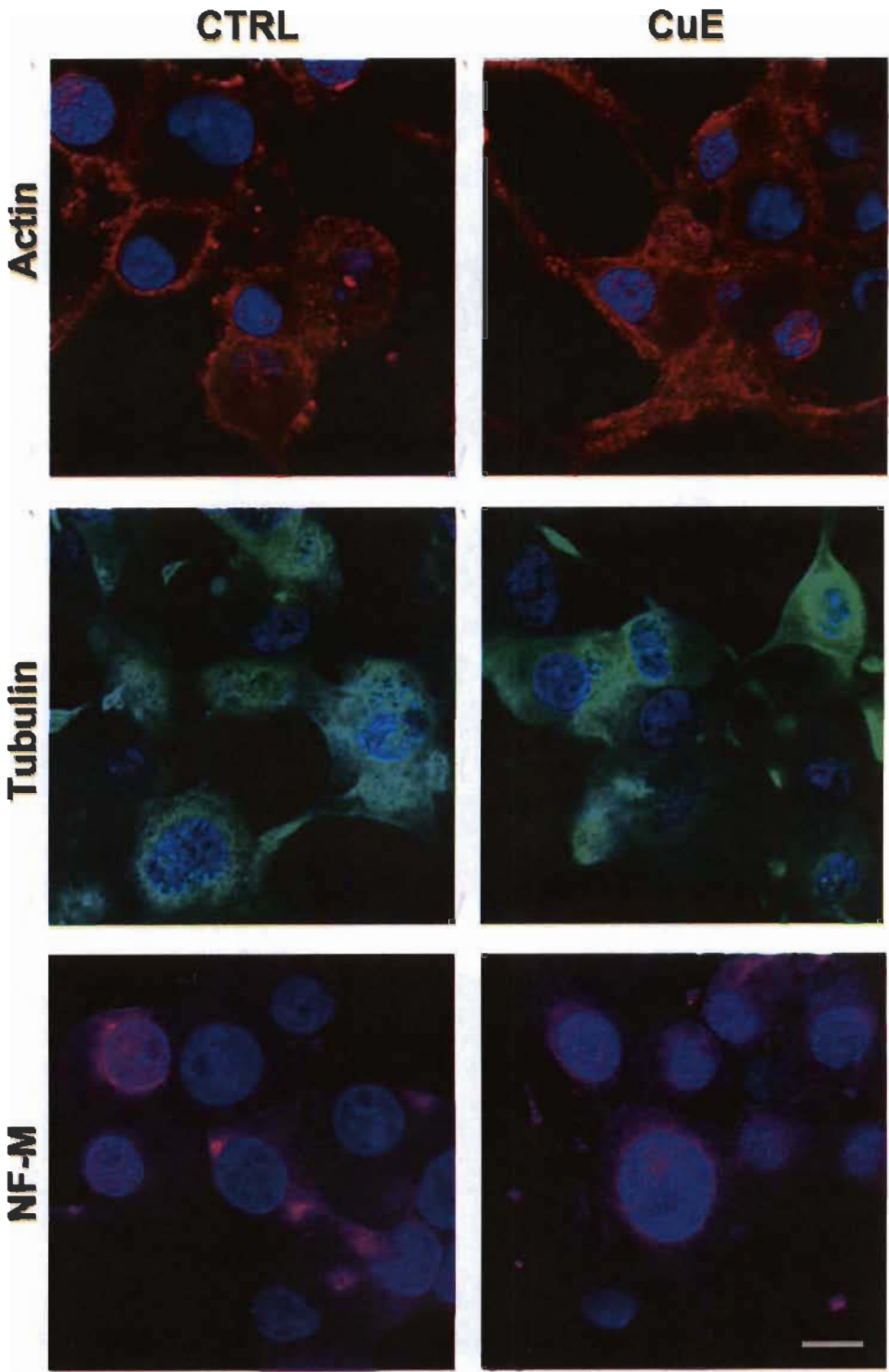


Figure 11



CHAPITRE III

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Afin d'évaluer l'effet de la CuE sur la fonction lysosomale, nous avons effectué le dosage colorimétrique de la cathepsine B. Cette enzyme est présente en grande quantité dans les lysosomes et permet la dégradation protéique qui fait la spécificité de ces organites. Considérant les effets protecteurs de la CuE sur notre paradigme neuronal dans lequel elle apparaît réguler l'autophagie à la baisse, nous avons voulu savoir si la fonction de dégradation des lysosomes restait la même en présence de la CuE. L'hypothèse derrière cette expérience vient du fait que si les lysosomes sont plus performants, les autophagosomes seront dégradés, et donc disparus, plus rapidement. Cela permettrait une élimination plus rapide et efficace des orgarnites endommagés par le stress oxydant causé par le MPP⁺, ce qui, au final, serait protecteur pour la cellule.

Tel que présenté à la figure 3.1, l'activité enzymatique de la cathepsine B, suite au traitement avec la CuE, est élevée d'environ 15% par rapport au contrôle: une différence significative. Il s'agit donc d'une intéressante piste pouvant expliquer les effets bénéfiques de ce phytostérol sur la survie neuronale. Il n'existe par contre rien, pour l'instant, permettant d'expliquer par quel moyen la CuE peut modifier l'activité de la cathepsine B. Ce résultat démontre tout de même qu'il serait pertinent, dans des expériences futures, d'étudier plus en profondeur les effets de la CuE sur les lysosomes. Les effets morphologiques grossiers sont présentés à la figure 10 de l'article, mais la figure 3.1 est la seule permettant de lever le voile sur les effets biochimiques et enzymatiques de la dégradation lysosomale.

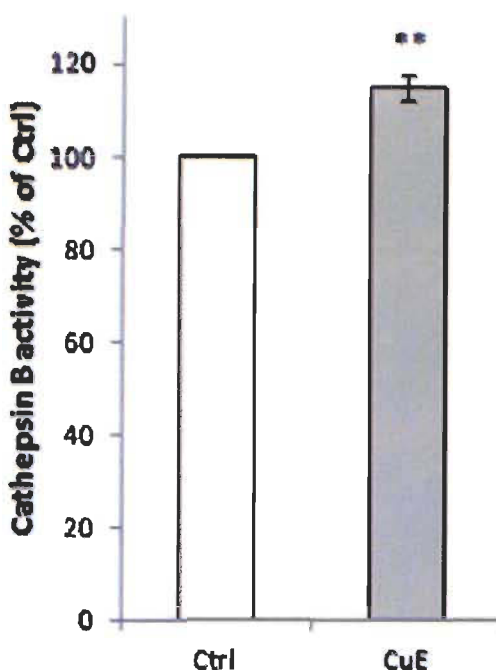


Figure 3.1 Activité enzymatique de la cathepsine B dans les cellules traitées ou non à la CuE. Les valeurs représentent la moyenne de 8 échantillons provenant de 4 expériences indépendantes. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. $n = 4$. ** $P < 0,01$ vs. Ctrl.

Afin de confirmer les effets anti-tumoraux de notre extrait de CuE, nous l'avons testé sur nos cellules PC12 non-différenciées, donc cultivées sans le facteur de croissance du nerf (NGF). Ces cellules sont issues d'une tumeur des cellules catécholaminergiques d'une glande surrénale de rat, elles sont donc cancéreuses et prolifèrent rapidement dans les conditions optimales. Dans la figure 3.2, nous pouvons observer une importante mort cellulaire chez les cellules PC12 soumises à une dose micromolaire de CuE, ce qui est concordant avec la littérature (Hung, Chang et al. 2013). Les effets mortels de la CuE se sont atténués à partir d'une dilution de 10^{-8} M, mais il est très intéressant d'observer la cytotoxicité en présence de MPP^{+} . Sur les cellules non-traitées à la CuE, le MPP^{+} cause la mort d'environ 30% des cellules. Or, en présence de CuE, ce pourcentage peut monter jusqu'à 60% même lorsque la dose de CuE seule ne cause pas la mort cellulaire. Il s'agirait donc d'un effet synergistique entre le MPP^{+} et la CuE qui apparaît uniquement dans les cellules cancéreuses puisque dans les PC12 différenciées neuronales, l'ajout de

ces deux composés abaisse la mort cellulaire à seulement 10% du contrôle (figure 2 de l'article).

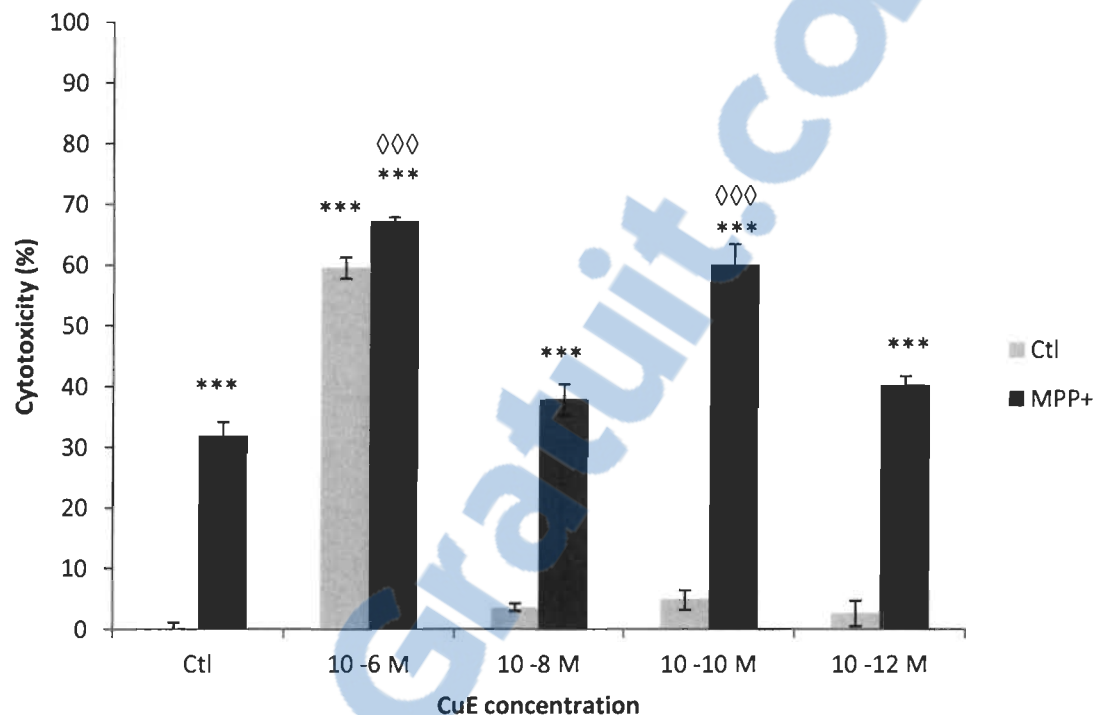


Figure 3.2 Cytotoxicité de la CuE et du MPP⁺ sur les cellules PC12 natives. La CuE à une dose de 10⁻⁶ M est toxique pour les cellules. On peut aussi noter que ses effets neuroprotecteurs sont totalement abolis chez les cellules non-neuronales. Les valeurs représentent la moyenne de 6 échantillons provenant de 3 expériences indépendantes, pour un total de 18 échantillons. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. $n = 3$. *** $P < 0,001$ vs. Ctrl, ◇◇◇ $P < 0.001$ vs. MPP+.

CHAPITRE IV

CONCLUSION

Les recherches effectuées dans notre laboratoire de neurobiologie cellulaire tentent depuis des années de découvrir des molécules naturelles aux propriétés neuroprotectrices. La Cucurbitacine E s'ajoute dorénavant à la longue liste de composés efficaces afin de repousser l'avancée des maladies neurodégénératives. Nous avons démontré son potentiel à combattre la neurotoxicité et à moduler l'autophagie cellulaire. Ces résultats démontrent pour la première fois un potentiel neuroprotecteur d'une molécule de la classe des cucurbitacines, des triterpènes très amers que l'on retrouve majoritairement dans les plantes de la famille des Cucurbitacées. La structure plutôt stéroïdienne de la CuE semblait prometteuse pour ses effets protecteurs, puisque de nombreux stéroïdes et phytostérols ont démontré de telles qualités. Par contre, la découverte de son effet sur l'autophagie est novatrice et ouvrira la porte à de nouvelles études sur le sujet, dans notre laboratoire et sûrement ailleurs.

C'est à des concentrations très petites de 0,1 nM que la CuE a révélé son potentiel neuroprotecteur face au test de cytotoxicité classique (LDH) et à l'apoptose. Nos études sur ses propriétés antioxydantes n'ont pas démontré d'effet du pré-traitement à la cucurbitacine sur le stress oxydant entraîné par le blocage du complexe I de la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie par le MPP⁺. Or, ce stress cellulaire engendre normalement un phénotype particulier des lysosomes et des mitochondries quant à leurs proportions et leur disposition cellulaire (Cao, Yang et al. 2010, Kim-Han, Antenor-Dorsey et al. 2011). Le MPP⁺ provoque une certaine disparition des lysosomes et leur concentration dans la zone périnucléaire (voir Fig. 10 de l'article). Les mitochondries apparaissent aussi plus fragmentées et ponctuelles, par opposition à leur distribution plus diffuse lorsqu'elles sont plus allongées et saines (Kalivendi, Cunningham et al. 2004). Cela est dû au stress oxydant lié au blocage de la chaîne de transport d'électrons, qui entraîne la fragmentation des mitochondries et empêche l'acidification des lysosomes.

Le pré-traitement à la CuE semble protéger les organites et permet de conserver une structure et une localisation qui sont plus semblables aux conditions contrôles, avec et sans la CuE (fig. 10). Le mécanisme de cet effet protecteur n'est pas lié à une diminution de l'apparition des radicaux libres et autres ROS, puisque les analyses d'oxydation n'ont pas démontré de baisse significative (figures 4 et 5 de l'article). La CuE agirait donc par un tout autre mécanisme afin de préserver la structure des mitochondries et la présence des lysosomes dans tout le soma neuronal.

Un des effets les plus intenses exercés par la CuE et documentés dans la littérature scientifique récente est son inhibition de la dépolymérisation des filaments d'actine (Duncan, Duncan et al. 1996, Momma, Masuzawa et al. 2008, Sorensen, Iacob et al. 2012). En outre, l'équilibre normal du cytosquelette comporte la polymérisation et la dépolymérisation simultanée des filaments d'actine afin de permettre un dynamisme au niveau de la motilité, de la neurotransmission, des différents transports cellulaires, du remodelage des organites, etc. L'inhibition de cet équilibre engendre la formation d'agrégats d'actine aberrants n'étant plus à même d'exercer les fonctions cellulaires du cytosquelette. Les effets subséquents peuvent engendrer la mort de la cellule, notamment en empêchant la cytokinèse chez les cellules mitotiques, une étape essentielle de la division cellulaire.

Considérant ceci, nous avons cru essentiel de faire une mise en évidence du cytosquelette par microscopie à fluorescence afin d'observer un éventuel changement au niveau de la structure et de la distribution des filaments d'actine, et du cytosquelette en général, dans nos cellules neuronales. Les doses utilisées dans les précédentes études, pour lesquelles le déséquilibre de l'actine était facilement visible, sont de l'ordre de 7 à 50 nM pour le groupe de Duncan, de 20 nM pour le groupe de Momma, de 0,5 à 1,5 μ M pour le groupe de Sørensen et de 0,2 μ M pour le groupe de Zhang (Zhang, Li et al. 2012). Dans notre expérience, les cellules ont été traitées à une concentration de 0,1 nM de CuE durant 3 heures (pré-traitement) puis 24 heures (traitement). Suite à cela, nous n'avons observé aucun changement phénotypique du cytosquelette d'actine à l'aide de l'immunofluorescence. Afin de s'assurer que la structure cellulaire n'était pas affectée, nous avons aussi observé les microtubules et les trois types de neurofilaments (les légers et lourds ne sont pas présentés dans la figure). Tel qu'attendu, nous n'avons pas non plus

pu observer de différences à ce niveau. Cela peut impliquer, d'une part, la dose très petite de CuE utilisée dans ces expériences. Ensuite, les cellules neuronales PC12 ont toutes les qualités des neurones adultes, c'est-à-dire qu'ils sont post-mitotiques. Dans la plupart des études mentionnées ci-haut, les cellules utilisées étaient des cellules tumorales dont le cycle cellulaire est nécessairement rapide, ce qui implique un remodellement constant du cytosquelette. L'actine étant cruciale pour plusieurs étapes de la mitose dont la cytokinèse, il est possible que des structures aberrantes comme des agrégats soient apparus plus vite dans ce modèle. Or, il ne faudrait pas croire que le cytosquelette d'un neurone n'est pas actif, bien au contraire : le transport vésiculaire et la croissance des axones et dendrites sollicitent constamment les filaments d'actine. Il est donc intéressant que d'un point de vue qualitatif, ces fonctions ne soient pas apparues comme étant altérées par la CuE.

L'étude des effets de la CuE sur l'autophagie ont commencé avec des tests colorimétriques en épifluorescence permettant de mettre en évidence différents compartiments cellulaires. L'acridine orange fut la première candidate puisqu'elle permet de colorer en rouge les compartiments acides de la cellule. Parmi ceux-ci, on retrouve bien entendu les lysosomes, mais aussi les autophagosomes et les endosomes tardifs, qui ont déjà fusionné avec un ou plusieurs lysosomes et sont donc en voie d'être dégradés. Le traitement au MPP^+ a causé une disparition quasi-totale des vacuoles marquées à l'acridine orange, tel que démontré à la figure 6 de l'article. Ceci est confirmé par la disparition partielle des lysosomes qui a été observée en immunofluorescence (Fig. 10). Or, considérant que l'acridine orange marque uniquement les compartiments acides, on peut donc avancer l'hypothèse que les lysosomes restants ne parviendraient pas à s'acidifier et ne peuvent donc pas retenir la teinture rouge. Cela peut s'expliquer par la carence en ATP des cellules traitées au MPP^+ , qui bloque la chaîne de transport d'électrons mitochondriale (Singer and Ramsay 1990). Les pompes à protons des lysosomes ont un besoin essentiel d'ATP pour acidifier la lumière lysosomale. Le traitement à la CuE, pour sa part, n'a pas semblé rétablir le pH des lysosomes de la cellule, ou bien rétablir leur nombre. Cela peut sembler peu encourageant, mais il est intéressant de constater que la CuE seule, sans traitement au

MPP⁺, a augmenté significativement le nombre de vacuoles marquées chez les cellules saines (Fig. 6).

De plus, nous avons dosé l'activité de dégradation protéique des lysosomes en analysant l'activité de la cathepsine B, une protéase lysosomale très répandue. Il s'est avéré que suite au traitement avec la CuE, l'activité de la cathepsine B s'est vue significativement augmentée, tel que reporté dans la figure 3.1. Cet effet intéressant semble faire pencher le mécanisme d'action de notre composé en faveur d'une plus grande dégradation autophagique, puisqu'il pourrait augmenter la dégradation des agrégats protéiques et des mitochondries endommagées par les lysosomes et ainsi contrer les effets délétères du MPP⁺ sur cet organe. La source de cette activité demeure par contre inconnue, puisqu'aucune interaction directe de la CuE avec les lysosomes n'a été décrite à ce jour. Il pourrait s'agir d'un effet indirect exercé par le phytostérol sur des protéines de signalisation, par exemple.

D'autres analyses ont donc été effectuées ensuite afin d'expliquer un peu mieux les effets cellulaires de la CuE. Le Cyto-ID, un colorant spécifique pour les autophagosomes, a été utilisé afin de mettre en évidence le contenu en vacuoles autophagiques des neurones après le traitement à la CuE (Fig. 7). Au final, il semble que le nombre de vacuoles autophagiques détectées par le Cyto-ID ne soit pas altéré par le traitement. Or, de façon intéressante, c'est plutôt la taille des vacuoles qui a grossi suite à l'ajout de la CuE dans le milieu de traitement, comme en témoigne la figure 7B, où l'on peut voir qu'en présence de CuE, avec ou sans MPP⁺, le nombre de vacuoles plus grosses qu'un micron est environ deux fois plus élevé. Cela pourrait laisser supposer que les vacuoles ont fusionné plus souvent, ou mûri plus longuement, en présence du phytostérol. À l'inverse, il serait aussi possible que si la dégradation des autophagosomes est ralentie, ceux-ci ont plus de temps pour fusionner entre eux. Le dosage de l'activité de la cathepsine B, qui présente une augmentation en présence de CuE ne semble pas aller dans ce sens, mais d'autres facteurs pourraient être à l'œuvre ici. La littérature scientifique ne reporte rien sur la taille des vacuoles autophagiques en fonction des conditions cellulaires, donc il est pour l'instant impossible d'élaborer d'autres hypothèses.

Considérant que la protéine LC3 est la candidate par excellence afin de mettre en évidence la macroautophagie, nous l'avons observée en immunofluorescence (Klionsky, Abdalla et al. 2012). Cette protéine présente sous deux formes, soit la forme soluble et la forme membranaire, est incluse dans les membranes des autophagosomes et est donc la seule protéine à pouvoir les marquer de façon spécifique. En plus, nous avons fait l'usage d'un inhibiteur pharmacologique particulier : la bafilomycine A1 (Baf). Celle-ci prévient la fusion lysosomale et provoque donc l'accumulation des autophagosomes dans le cytoplasme (Yamamoto, Tagawa et al. 1998). Nous avons donc pu observer cet effet dans nos cellules PC12 marquées en immunofluorescence pour la protéine LC3 (Fig. 8). Autre fait saillant : nous avons découvert d'autres vacuoles de très grande taille dans les conditions traitées à la CuE. Par contre, ces dernières ne furent pas assez nombreuses pour augmenter significativement la taille moyenne des vacuoles dans leurs conditions respectives. Leur apparition semble donc un événement sporadique dans ce cas-ci. Pour la condition traitée à la fois avec la CuE et ensuite avec la bafilomycine, nous avons été surpris de constater que le nombre total de vacuoles LC3-positives était moindre que lorsque les cellules étaient seulement soumises à la bafilomycine (Fig. 8B). En fait, le nombre moyen de vacuoles ressemblait grandement aux chiffres correspondant à la condition contrôle. Ceci pourrait donc signifier une moins grande production d'autophagosomes en présence de CuE puisque la dégradation est impossible avec le traitement à la bafilomycine. Il est intéressant de constater l'apparente incohérence entre ce résultat, obtenu avec le marquage spécifique de la protéine LC3, et les résultats de la figure 7, où le marquage est effectué avec un colorant, le Cyto-ID. Il serait donc envisageable que le colorant puisse marquer d'autres organites ou vésicules cellulaires que les autophagosomes, ce qui diminuerait sa spécificité.

Dans l'analyse en immunobuvardage de type Western, nous avons étudié la protéine p62. Cette protéine sert de jonction ou d'ancrage entre le matériel à dégrader et la protéine LC3, qui est incluse dans la membrane du phagophore (Su and Wang 2011). Elle est donc dégradée par le processus autophagique mais s'accumule si celui-ci est bloqué, par exemple avec la bafilomycine. Comme il était attendu, le traitement des cellules avec cette dernière a provoqué l'accumulation de p62, tel que détecté par immunobuvardage, à la figure 9. Le traitement au phytostérol seul, pour sa part, a aussi

provoqué une légère accumulation de p62, indiquant potentiellement une inhibition de leur dégradation, ce qui semble corrélér les résultats obtenus avec le marquage de LC3. De plus, le pré-traitement à la CuE n'a pas modifié l'accumulation de p62 due à l'agent pharmacologique bafilomycine. Il semblerait donc que la CuE ne puisse aggraver l'accumulation d'autophagosomes engendrée par l'inhibition de la dégradation autophagique.

En somme, les analyses de l'effet du phytostérol Cucurbitacine E sur l'autophagie donnent des résultats nous indiquant assez clairement que d'autres expériences seront à faire afin de découvrir le fin mot de l'histoire. Des obstacles se sont en effet présentés dans ces analyses, ne nous facilitant pas la tâche. Considérant que nous utilisons une molécule naturelle à des doses faibles et inoffensives, il est donc normal qu'il soit difficile d'observer des contrastes marqués face à des toxines puissantes et des inhibiteurs pharmacologiques précis, comme le DDC et la bafilomycine. Malgré toutes les expériences novatrices que nous avons effectuées sur la Cucurbitacine E, de nombreuses autres resteront à faire afin d'explorer plus complètement toutes les facettes de son potentiel curatif. Au niveau de l'autophagie cellulaire, par exemple, des analyses restent à faire afin de prouver hors de tout doute dans quel sens la CuE influence le flux autophagique. Nous avons pu poser d'intéressantes hypothèses et pistes de solution, mais il reste encore beaucoup de pas à franchir afin d'obtenir un portrait plus complet et juste. Parmi les expériences incontournables, l'évaluation du contenu en LC3-II des cellules par immunobuvardage de type Western serait très important. Nous avons maintes et maintes fois tenté de le réaliser dans le laboratoire, mais notre modèle semble très peu se prêter à ce genre d'expérience. L'idéal serait donc d'utiliser une lignée de PC12 exprimant de manière stable un allèle de LC3 lié à la protéine GFP, qui confère une fluorescence verte facile à détecter. Par ceci, toutes les études de mise en évidence de LC3, un marqueur essentiel pour étudier l'autophagie, seraient grandement facilitées. Des analyses de colocalisation avec d'autres facteurs pourraient aussi être effectuées très facilement avec ce modèle. Ensuite, pour l'immunobuvardage, il serait intéressant d'observer la modulation de différentes protéines régulatrices de l'autophagie comme les différentes protéines Atg ainsi que le facteur Beclin-1. Il serait donc possible d'observer

soit une modulation directe de la part du traitement à la CuE, ou bien une modulation par le MPP⁺ et une potentielle récupération par le pré-traitement neuroprotecteur.

L'utilisation de la 3-méthyladénine (3-MA) comme agent pharmacologique inhibiteur de la formation des autophagosomes serait aussi très intéressante pour étudier l'effet de la CuE sur la création même des vacuoles. On pourrait ainsi tenter de voir un effet plus hâtif de ce phytostérol dans le processus de dégradation autophagique.

Un test important n'a pas pu être effectué dans cette recherche et présente une certaine limite aux résultats présentés. Considérant la structure de la CuE qui ressemble assez fortement aux stéroïdes classiques tels que l'œstradiol, il aurait été fort intéressant d'analyser l'expression des récepteurs nucléaires aux œstrogènes, ER- α et ER- β . Ces récepteurs sont d'importants médiateurs de la survie cellulaire et expliquent en partie les effets neuroprotecteur des œstrogènes, tel que décrit plus tôt par notre laboratoire (Gelinas and Martinoli 2002). Or, l'activation des récepteurs nucléaires aux œstrogènes n'est pas bon signe puisqu'il s'agit d'une cause connue d'augmentation des cancers hormono-dépendants. Un effet activateur de la CuE sur ceux-ci pourrait donc constituer un bémol à son utilisation clinique et devra donc être étudiée plus en profondeur éventuellement.

D'autres importantes particularités et effets de la CuE *in vivo* doivent encore être étudiés afin de confirmer son efficacité et son potentiel comme thérapie adjuvante des maladies neurodégénératives. Par exemple, il n'a toujours pas été confirmé que la CuE puisse passer la barrière hémato-encéphalique et atteindre le système nerveux central. Au vu de sa structure fortement hydrophobe, il semble logique que son administration par injection ou voie orale soit possible, mais cela reste à confirmer. Les seules études jusqu'à maintenant qui utilisent une administration systémique de la CuE ont utilisé une méthode par injection intra-péritonéale (Abdelwahab, Hassan et al. 2011, Zhang, Li et al. 2012). Il n'est donc pas connu si la CuE peut être administrée de façon orale et pénétrer la circulation sanguine sans être métabolisée. Ces étapes devront nécessairement être faites avant la mise au point de traitements adjuvants à base de cucurbitacines.

Actuellement, les effets cellulaires de la Cucurbitacine E ont été étudiés majoritairement sur les aspects suivants : effets anti-inflammatoires (Abdelwahab,

Hassan et al. 2011), inhibition du facteur de transcription STAT3 (Huang, Yang et al. 2012), stabilisation anormale du cytosquelette d'actine (Sorensen, Iacob et al. 2012) et diminution de l'agressivité tumorale (Zhang, Li et al. 2012). Ces applications ont été pratiquement toutes analysées dans un contexte de développement tumoral, que ce soit sur des cellules en culture ou chez l'animal. Il est donc difficile de transposer ces mécanismes dans notre modèle de neurodégénérescence. Nous avons donc fait de notre mieux pour adresser la majeure partie des problématiques soulevées par la CuE en les transposant dans les neurones dopaminergiques. La cytotoxicité apparente de ce composé ne s'est pas manifestée dans les cellules PC12 neuronales (Fig. 2), obtenant des résultats comparables au contrôle. Pour les cellules PC12 non-différenciées, il en fut tout autre : la CuE s'est montrée toxique telle qu'elle l'est dans les autres études effectuées sur des cellules cancéreuses et ce à des doses micromolaires (voir Figure 3.2). Au niveau du cytosquelette d'actine, nous l'avons mis en évidence afin d'éviter un phénotype aberrant chez nos neurones protégés par la CuE. Cela aura eu comme effet de neutraliser son potentiel protecteur puisque les cellules auraient été vivantes, quoique non-fonctionnelles du point de vue neuronal.

L'évaluation du potentiel anti-inflammatoire de la CuE dans un contexte neuronal serait une expérience très intéressante à effectuer. Il est maintenant bien connu que les microglies, cellules immunitaires du cerveau, jouent un rôle crucial dans la pathogénèse de la MP en médiant un rôle inflammatoire dont la finalité est mortelle pour les neurones environnants. Nous avons déjà étudié dans notre laboratoire un modèle de co-culture neuronales et microgliales dans lequel le MPP⁺ étant utilisé en tant que médiateur de l'inflammation, entraînant donc la sécrétion de facteurs (cytokines, chimiokines) par les microglies et ainsi l'apoptose des neurones (Bournival, Plouffe et al. 2012). Nous avons réussi à prévenir cette cascade toxique à l'aide de molécules naturelles anti-inflammatoires, soit la quercétine et la sésamine, qui possèdent elles aussi des caractéristiques neuroprotectrices sur modèle neuronal seul. Au vu du potentiel anti-inflammatoire de la CuE, par exemple en inhibant l'expression du facteur COX-2, (Abdelwahab, Hassan et al. 2011), il est possible de supposer que des résultats très favorables pourraient être obtenus en co-culture.

En résumé, ces expérimentations ont permis de découvrir de nouvelles propriétés pleines de potentiel pour la Cucurbitacine E, une petite molécule peu connue mais qui fut pourtant longtemps utilisée en médecine traditionnelle européenne pour ses capacités curatives. Ce phytostérol a su protéger des cellules neuronales dopaminergiques de l'apoptose induite par le MPP⁺, une neurotoxine répliquant le syndrome parkinsonien *in vitro*. Contrairement à beaucoup d'autres phytostérols et polyphénols naturels, la CuE n'a pas présenté de propriétés antioxydantes face au MPP⁺ et au DDC, deux oxydants aux mécanismes différents. La particularité de la CuE fut finalement révélée à travers l'autophagie cellulaire, dont elle module les organites dans leur nombre et leur taille, ainsi que leur métabolisme. Plusieurs méthodes furent utilisées afin de parvenir à cette conclusion, soit l'immunofluorescence de LC3, l'immunobuvardage de type Western pour p62, l'utilisation de la bafilomycine pour ses propriétés inhibitrices de la fusion lysosomale et les colorants acridine orange et Cyto-ID. La CuE semble exercer des effets inhibiteurs sur la dégradation des autophagosomes ou bien sur leur formation, tel que démontré par la réduction du nombre de vacuoles marquées par LC3 et par l'augmentation de la protéine p62. Avec la coloration au Cyto-ID, elle semble au contraire augmenter le nombre de vacuoles de grande taille, ce qui peut laisser croire que ces dernières ont un plus long temps de maturation, ou une plus grande tendance à fusionner entre elles, potentiellement avec les endosomes. Une constante dans tous ces résultats est que la CuE, lorsque mise à l'épreuve face au MPP⁺ ou à la bafilomycine, a toujours tendance à rétablir des conditions semblables aux conditions contrôle.

Au final, nous avons pu dresser un portrait complexe quoiqu'incomplet des effets cellulaires de la CuE sur l'autophagie et ainsi ouvrir la porte à d'intéressantes hypothèses sur son mécanisme d'action, par lequel elle parvient à exercer ses effets neuroprotecteurs tant convoités. Nous n'avons pas pu précisément déterminer la cible cellulaire de la CuE, mais il est bien certain que celle-ci influence les lysosomes et leurs propriétés catalytiques, influençant du fait même l'autophagie cellulaire, un mécanisme crucial dans l'homéostasie des neurones.

L'autophagie est aussi à l'origine de plusieurs recherches en prévention des maladies neurodégénératives. Elle peut en effet précipiter la toxicité associée aux agrégats d' α -synucléine lorsqu'elle ne parvient pas à les digérer, causant ainsi

l'accumulation de vacuoles cytoplasmiques qui entravent la circulation des organites et le dynamisme du cytosquelette. D'autre part, une augmentation légère et contrôlée de l'autophagie peut permettre aux neurones de mieux survivre face au stress oxydant en dégradant au fur et à mesure les protéines et lipides oxydés, avant que ceux-ci ne puissent avoir d'effets toxiques sur la cellule. Il s'agit donc d'une arme à double tranchant dans la lutte contre les maladies neurodégénératives mais malgré ce caractère imprévisible, l'autophagie demeure une cible de choix pour l'étude des fondements de la dégénérescence neuronale. La Cucurbitacine E, avec ses effets modérés sur ce mécanisme catalytique, propose une avenue fort intéressante pour l'établissement de thérapies adjuvantes. En effet, à très petites doses, elle possède un effet neuroprotecteur marqué, tout en ayant une activité modulatrice de l'autophagie qui ne saurait être exagérée. Il semble donc logique d'estimer qu'un traitement à base de cucurbitacines poserait peu d'effets secondaires tout en ayant réellement un effet bienfaiteur. D'autres études devront être faites afin de prouver l'innocuité d'un tel traitement, mais nous avons pu ouvrir la voie à l'établissement de telles thérapies, en prouvant qu'une molécule naturelle peut bel et bien exercer des effets concrets sur une maladie actuellement incurable telle que la maladie de Parkinson.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (2014). "Qu'est-ce que la maladie de Parkinson?" Retrieved 14, 2014, from [http://www.parkinson.ca/site/c.jplMKWOBJoG/b.5187667/k.4DB6/Qu8217estce la maladie de Parkinson.htm](http://www.parkinson.ca/site/c.jplMKWOBJoG/b.5187667/k.4DB6/Qu8217estce%20la%20maladie%20de%20Parkinson.htm).
- Abdelwahab, S. I., L. E. Hassan, H. M. Sirat, S. M. Yagi, W. S. Koko, S. Mohan, M. M. Taha, S. Ahmad, C. S. Chuen, P. Narrima, M. M. Rais and A. H. Hadi (2011). "Anti-inflammatory activities of cucurbitacin E isolated from *Citrullus lanatus* var. *citroides*: role of reactive nitrogen species and cyclooxygenase enzyme inhibition." *Fitoterapia* **82**(8): 1190-1197.
- Ali, A. B., D. S. Nin, J. Tam and M. Khan (2011). "Role of chaperone mediated autophagy (CMA) in the degradation of misfolded N-CoR protein in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells." *PLoS One* **6**(9): e25268.
- Ang, E. T., Y. K. Tai, S. Q. Lo, R. Seet and T. W. Soong (2010). "Neurodegenerative diseases: exercising toward neurogenesis and neuroregeneration." *Front Aging Neurosci* **2**.
- Attard, E. (2011). "Use of Extracts from Squirting Cucumber (*Ecballium elaterium*) Seeds in Health." 1079-1086.
- Attard, E. G. and A. Scicluna-Spiteri (2001). "Ecballium elaterium: an in vitro source of cucurbitacins." *Fitoterapia* **72**(1): 46-53.
- Bae, N., T. Ahn, S. Chung, M. S. Oh, H. Ko, H. Oh, G. Park and H. O. Yang (2011). "The neuroprotective effect of modified Yeoldahanso-tang via autophagy enhancement in models of Parkinson's disease." *J Ethnopharmacol* **134**(2): 313-322.
- Banerjee, R., M. F. Beal and B. Thomas (2010). "Autophagy in neurodegenerative disorders: pathogenic roles and therapeutic implications." *Trends Neurosci* **33**(12): 541-549.
- Barcia, C., V. de Pablos, V. Bautista-Hernandez, A. Sanchez-Bahillo, I. Bernal, E. Fernandez-Villalba, J. Martin, R. Banon, A. Fernandez-Barreiro and M. T. Herrero (2005). "Increased plasma levels of TNF-alpha but not of IL1-beta in MPTP-treated monkeys one year after the MPTP administration." *Parkinsonism Relat Disord* **11**(7): 435-439.
- Benbrook, D. M. and A. Long (2012). "Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis." *Exp Oncol* **34**(3): 286-297.

- Bournival, J., M. Plouffe, J. Renaud, C. Provencher and M. G. Martinoli (2012). "Quercetin and sesamin protect dopaminergic cells from MPP⁺-induced neuroinflammation in a microglial (N9)-neuronal (PC12) coculture system." Oxid Med Cell Longev **2012**: 921941.
- Bove, J., M. Martinez-Vicente and M. Vila (2011). "Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights." Nat Rev Neurosci **12**(8): 437-452.
- Brunk, U. T. and A. Terman (2002). "The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis." Eur J Biochem **269**(8): 1996-2002.
- Bureau, G., F. Longpre and M. G. Martinoli (2008). "Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation." J Neurosci Res **86**(2): 403-410.
- Bursch, W., A. Ellinger, C. Gerner, U. Frohwein and R. Schulte-Hermann (2000). "Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others?" Ann N Y Acad Sci **926**: 1-12.
- Bussell, R., Jr. and D. Eliezer (2001). "Residual structure and dynamics in Parkinson's disease-associated mutants of alpha-synuclein." J Biol Chem **276**(49): 45996-46003.
- Campos, P. B., B. S. Paulsen and S. K. Rehen (2014). "Accelerating neuronal aging in in vitro model brain disorders: a focus on reactive oxygen species." Front Aging Neurosci **6**: 292.
- Canada, S. P. d. (2012). Lignes directrices canadiennes sur la maladie de Parkinson. S. P. Canada.
- Canu, N., R. Tufi, A. L. Serafino, G. Amadoro, M. T. Ciotti and P. Calissano (2005). "Role of the autophagic-lysosomal system on low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells." J Neurochem **92**(5): 1228-1242.
- Cao, B. Y., Y. P. Yang, W. F. Luo, C. J. Mao, R. Han, X. Sun, J. Cheng and C. F. Liu (2010). "Paeoniflorin, a potent natural compound, protects PC12 cells from MPP⁺ and acidic damage via autophagic pathway." J Ethnopharmacol **131**(1): 122-129.
- Chan, K. T., K. Li, S. L. Liu, K. H. Chu, M. Toh and W. D. Xie (2010). "Cucurbitacin B inhibits STAT3 and the Raf/MEK/ERK pathway in leukemia cell line K562." Cancer Lett **289**(1): 46-52.
- Chen, J. C., M. H. Chiu, R. L. Nie, G. A. Cordell and S. X. Qiu (2005). "Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities." Nat Prod Rep **22**(3): 386-399.

- Chen, X. L., Y. Y. Xiong, G. L. Xu and X. F. Liu (2013). "Deep brain stimulation." Interv Neurol **1**(3-4): 200-212.
- Cheng, S. E., I. T. Lee, C. C. Lin, W. L. Wu, L. D. Hsiao and C. M. Yang (2013). "ATP mediates NADPH oxidase/ROS generation and COX-2/PGE2 expression in A549 cells: role of P2 receptor-dependent STAT3 activation." PLoS One **8**(1): e54125.
- Conditions, N. C. C. f. C. (2006). "Parkinson's disease: national clinical guideline for diagnosis and management in primary and secondary care." London Royal College of Physicians.
- Connolly, B. S. and A. E. Lang (2014). "Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review." JAMA **311**(16): 1670-1683.
- Cyr, M., F. Calon, M. Morissette, M. Grandbois, T. Di Paolo and S. Callier (2000). "Drugs with estrogen-like potency and brain activity: potential therapeutic application for the CNS." Curr Pharm Des **6**(12): 1287-1312.
- d'Ydewalle, C., E. Bogaert and L. Van Den Bosch (2012). "HDAC6 at the Intersection of Neuroprotection and Neurodegeneration." Traffic **13**(6): 771-779.
- Dauer, W. and S. Przedborski (2003). "Parkinson's disease: mechanisms and models." Neuron **39**(6): 889-909.
- de Lau, L. M. L. and M. M. B. Breteler (2006). "Epidemiology of Parkinson's disease." The Lancet Neurology **5**(6): 525-535.
- De Miranda, B. R., K. A. Popichak, S. L. Hammond, J. A. Miller, S. Safe and R. B. Tjalkens (2014). "Novel para-phenyl substituted diindolylmethanes protect against MPTP neurotoxicity and suppress glial activation in a mouse model of Parkinson's disease." Toxicol Sci.
- Debnath, J., E. H. Baehrecke and G. Kroemer (2005). "Does autophagy contribute to cell death?" Autophagy **1**(2): 66-74.
- Dice, J. F. (1988). "Microinjected ribonuclease A as a probe for lysosomal pathways of intracellular protein degradation." J Protein Chem **7**(2): 115-127.
- Duncan, K. L., M. D. Duncan, M. C. Alley and E. A. Sausville (1996). "Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells." Biochem Pharmacol **52**(10): 1553-1560.
- Dutta, G., P. Zhang and B. Liu (2008). "The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery." Fundam Clin Pharmacol **22**(5): 453-464.

- Gelinas, S. and M. G. Martinoli (2002). "Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP⁺-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells." J Neurosci Res **70**(1): 90-96.
- Giasson, B. I., J. E. Duda, I. V. Murray, Q. Chen, J. M. Souza, H. I. Hurtig, H. Ischiropoulos, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2000). "Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions." Science **290**(5493): 985-989.
- Goetz, C. G. (2011). "The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies." Cold Spring Harb Perspect Med **1**(1): a008862.
- Gonzalez-Polo, R. A., M. Niso-Santano, M. A. Ortiz-Ortiz, A. Gomez-Martin, J. M. Moran, L. Garcia-Rubio, J. Francisco-Morcillo, C. Zaragoza, G. Soler and J. M. Fuentes (2007). "Inhibition of paraquat-induced autophagy accelerates the apoptotic cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells." Toxicol Sci **97**(2): 448-458.
- Hernan, M. A., S. M. Zhang, A. M. Rueda-deCastro, G. A. Colditz, F. E. Speizer and A. Ascherio (2001). "Cigarette smoking and the incidence of Parkinson's disease in two prospective studies." Ann Neurol **50**(6): 780-786.
- Hirsch, E. C. and S. Hunot (2009). "Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?" Lancet Neurol **8**(4): 382-397.
- Ho, Y. S., D. C. Poon, T. F. Chan and R. C. Chang (2012). "From small to big molecules: how do we prevent and delay the progression of age-related neurodegeneration?" Curr Pharm Des **18**(1): 15-26.
- Hsu, Y. C., T. Y. Huang and M. J. Chen (2014). "Therapeutic ROS targeting of GADD45gamma in the induction of G2/M arrest in primary human colorectal cancer cell lines by cucurbitacin E." Cell Death Dis **5**: e1198.
- Huang, J. and D. J. Klionsky (2007). "Autophagy and human disease." Cell Cycle **6**(15): 1837-1849.
- Huang, W. W., J. S. Yang, M. W. Lin, P. Y. Chen, S. M. Chiou, F. S. Chueh, Y. H. Lan, S. J. Pai, M. Tsuzuki, W. J. Ho and J. G. Chung (2012). "Cucurbitacin E Induces G(2)/M Phase Arrest through STAT3/p53/p21 Signaling and Provokes Apoptosis via Fas/CD95 and Mitochondria-Dependent Pathways in Human Bladder Cancer T24 Cells." Evid Based Complement Alternat Med **2012**: 952762.
- Hung, C. M., C. C. Chang, C. W. Lin, S. Y. Ko and Y. C. Hsu (2013). "Cucurbitacin E as inducer of cell death and apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cell line SAS." Int J Mol Sci **14**(8): 17147-17156.

- Jaeger, P. A. and T. Wyss-Coray (2009). "All-you-can-eat: autophagy in neurodegeneration and neuroprotection." Mol Neurodegener **4**: 16.
- Jayaprakasam, B., N. P. Seeram and M. G. Nair (2003). "Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*." Cancer Lett **189**(1): 11-16.
- Jeong, J. K., M. H. Moon, B. C. Bae, Y. J. Lee, J. W. Seol, H. S. Kang, J. S. Kim, S. J. Kang and S. Y. Park (2012). "Autophagy induced by resveratrol prevents human prion protein-mediated neurotoxicity." Neurosci Res **73**(2): 99-105.
- Kalivendi, S. V., S. Cunningham, S. Kotamraju, J. Joseph, C. J. Hillard and B. Kalyanaraman (2004). "Alpha-synuclein up-regulation and aggregation during MPP+-induced apoptosis in neuroblastoma cells: intermediacy of transferrin receptor iron and hydrogen peroxide." J Biol Chem **279**(15): 15240-15247.
- Kawaguchi, Y., J. J. Kovacs, A. McLaurin, J. M. Vance, A. Ito and T. P. Yao (2003). "The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress." Cell **115**(6): 727-738.
- Keller, J. N., F. F. Huang and W. R. Markesbery (2000). "Decreased levels of proteasome activity and proteasome expression in aging spinal cord." Neuroscience **98**(1): 149-156.
- Kim-Han, J. S., J. A. Antenor-Dorsey and K. L. O'Malley (2011). "The parkinsonian mimetic, MPP+, specifically impairs mitochondrial transport in dopamine axons." J Neurosci **31**(19): 7212-7221.
- Klionsky, D. J., F. C. Abdalla, H. Abeliovich, R. T. Abraham, A. Acevedo-Arozena, K. Adeli, L. Agholme, M. Agnello, P. Agostinis, J. A. Aguirre-Ghiso, H. J. Ahn, O. Ait-Mohamed, S. Ait-Si-Ali, T. Akematsu, S. Akira, H. M. Al-Younes, M. A. Al-Zeer, M. L. Albert, R. L. Albin, J. Alegre-Abarategui, M. F. Aleo, M. Alirezai, A. Almasan, M. Almonte-Becerril, A. Amano, R. Amaravadi, S. Amarnath, et al. (2012). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy." Autophagy **8**(4): 445-544.
- Koga, H. and A. M. Cuervo (2011). "Chaperone-mediated autophagy dysfunction in the pathogenesis of neurodegeneration." Neurobiol Dis **43**(1): 29-37.
- Kohutnicka, M., E. Lewandowska, I. Kurkowska-Jastrzebska, A. Czlonkowski and A. Czlonkowska (1998). "Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)." Immunopharmacology **39**(3): 167-180.
- Koike, M., M. Shibata, M. Tadakoshi, K. Gotoh, M. Komatsu, S. Waguri, N. Kawahara, K. Kuida, S. Nagata, E. Kominami, K. Tanaka and Y. Uchiyama

- (2008). "Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury." Am J Pathol **172**(2): 454-469.
- Kujoth, G. C., A. Hiona, T. D. Pugh, S. Someya, K. Panzer, S. E. Wohlgemuth, T. Hofer, A. Y. Seo, R. Sullivan, W. A. Jobling, J. D. Morrow, H. Van Remmen, J. M. Sedivy, T. Yamasoba, M. Tanokura, R. Weindruch, C. Leeuwenburgh and T. A. Prolla (2005). "Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging." Science **309**(5733): 481-484.
- Kunchithapautham, K. and B. Rohrer (2007). "Apoptosis and autophagy in photoreceptors exposed to oxidative stress." Autophagy **3**(5): 433-441.
- Lagrange, E., P. Krack, E. Moro, C. Ardouin, N. Van Blercom, S. Chabardes, A. L. Benabid and P. Pollak (2002). "Bilateral subthalamic nucleus stimulation improves health-related quality of life in PD." Neurology **59**(12): 1976-1978.
- Lebouvier, T., M. Neunlist, S. Bruley des Varannes, E. Coron, A. Drouard, J. M. N'Guyen, T. Chaumette, M. Tasselli, S. Paillusson, M. Flamand, J. P. Galmiche, P. Damier and P. Derkinderen (2010). "Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms." PLoS One **5**(9): e12728.
- Lee, H. C. and Y. H. Wei (1997). "Mutation and oxidative damage of mitochondrial DNA and defective turnover of mitochondria in human aging." J Formos Med Assoc **96**(10): 770-778.
- Lee, H. J., E. J. Bae and S. J. Lee (2014). "Extracellular alpha--synuclein-a novel and crucial factor in Lewy body diseases." Nat Rev Neurol **10**(2): 92-98.
- Lee, J. Y., Y. Nagano, J. P. Taylor, K. L. Lim and T. P. Yao (2010). "Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy." J Cell Biol **189**(4): 671-679.
- Levine, B. and J. Yuan (2005). "Autophagy in cell death: an innocent convict?" J Clin Invest **115**(10): 2679-2688.
- Liu, K., J. Huang, R. Chen, T. Zhang, L. Shen, J. Yang and X. Sun (2012). "Protection against neurotoxicity by an autophagic mechanism." Brazilian Journal of Medical and Biological Research **45**(5): 401-407.
- Malagelada, C., Z. H. Jin, V. Jackson-Lewis, S. Przedborski and L. A. Greene (2010). "Rapamycin protects against neuron death in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease." J Neurosci **30**(3): 1166-1175.
- Mirza, B., H. Hadberg, P. Thomsen and T. Moos (2000). "The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease." Neuroscience **95**(2): 425-432.

- Mishra, A. K., M. S. Ur Rasheed, S. Shukla, M. K. Tripathi, A. Dixit and M. P. Singh (2014). "Aberrant Autophagy and Parkinsonism: Does Correction Rescue from Disease Progression?" Mol Neurobiol.
- Mizushima, N. (2004). "Methods for monitoring autophagy." Int J Biochem Cell Biol **36**(12): 2491-2502.
- Mizushima, N. and M. Komatsu (2011). "Autophagy: renovation of cells and tissues." Cell **147**(4): 728-741.
- Mizushima, N., B. Levine, A. M. Cuervo and D. J. Klionsky (2008). "Autophagy fights disease through cellular self-digestion." Nature **451**(7182): 1069-1075.
- Mizushima, N., T. Yoshimori and B. Levine (2010). "Methods in mammalian autophagy research." Cell **140**(3): 313-326.
- Mogi, M., M. Harada, H. Narabayashi, H. Inagaki, M. Minami and T. Nagatsu (1996). "Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease." Neurosci Lett **211**(1): 13-16.
- Momma, K., Y. Masuzawa, N. Nakai, M. Chujo, A. Murakami, N. Kioka, Y. Kiyama, T. Akita and M. Nagao (2008). "Direct interaction of Cucurbitacin E isolated from *Alsomitra macrocarpa* to actin filament." Cytotechnology **56**(1): 33-39.
- Nakashima, H., T. Nguyen, W. F. Goins and E. A. Chiocca (2014). "ISG15 and ISG-15 linked proteins Can Associate with Members of the Selective Autophagic process, HDAC6 and SQSTM1/p62." J Biol Chem.
- Nakashima, S., H. Matsuda, A. Kurume, Y. Oda, S. Nakamura, M. Yamashita and M. Yoshikawa (2010). "Cucurbitacin E as a new inhibitor of cofilin phosphorylation in human leukemia U937 cells." Bioorg Med Chem Lett **20**(9): 2994-2997.
- Narendra, D. P. and R. J. Youle (2011). "Targeting mitochondrial dysfunction: role for PINK1 and Parkin in mitochondrial quality control." Antioxid Redox Signal **14**(10): 1929-1938.
- Ossig, C. and H. Reichmann (2015). "Treatment Strategies in Early and Advanced Parkinson Disease." Neurol Clin **33**(1): 19-37.
- Ouchi, Y., S. Yagi, M. Yokokura and M. Sakamoto (2009). "Neuroinflammation in the living brain of Parkinson's disease." Parkinsonism Relat Disord **15 Suppl 3**: S200-204.

- Pan, T., P. Rawal, Y. Wu, W. Xie, J. Jankovic and W. Le (2009). "Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction." Neuroscience **164**(2): 541-551.
- Parker, W. D., Jr., S. J. Boyson and J. K. Parks (1989). "Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease." Ann Neurol **26**(6): 719-723.
- Qiao, J., L. H. Xu, J. He, D. Y. Ouyang and X. H. He (2013). "Cucurbitacin E exhibits anti-inflammatory effect in RAW 264.7 cells via suppression of NF-kappaB nuclear translocation." Inflamm Res **62**(5): 461-469.
- Rajawat, Y. S., Z. Hilioti and I. Bossis (2009). "Aging: central role for autophagy and the lysosomal degradative system." Ageing Res Rev **8**(3): 199-213.
- Ravikumar, B., Z. Berger, C. Vacher, C. J. O'Kane and D. C. Rubinsztein (2006). "Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis." Hum Mol Genet **15**(7): 1209-1216.
- Rivera-Oliver, M. and M. Diaz-Rios (2014). "Using caffeine and other adenosine receptor antagonists and agonists as therapeutic tools against neurodegenerative diseases: A review." Life Sci **101**(1-2): 1-9.
- Rojas, P., P. Montes, C. Rojas, N. Serrano-Garcia and J. C. Rojas-Castaneda (2012). "Effect of a phytopharmaceutical medicine, Ginko biloba extract 761, in an animal model of Parkinson's disease: therapeutic perspectives." Nutrition **28**(11-12): 1081-1088.
- Rubinsztein, D. C., M. DiFiglia, N. Heintz, R. A. Nixon, Z. H. Qin, B. Ravikumar, L. Stefanis and A. Tolkovsky (2005). "Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair." Autophagy **1**(1): 11-22.
- Sandy, M. S., M. Armstrong, C. M. Tanner, A. K. Daly, D. A. Di Monte, J. W. Langston and J. R. Idle (1996). "CYP2D6 allelic frequencies in young-onset Parkinson's disease." Neurology **47**(1): 225-230.
- Schapansky, J., J. D. Nardozzi and M. J. LaVoie (2014). "The complex relationships between microglia, alpha-synuclein, and LRRK2 in Parkinson's disease." Neuroscience.
- Schapira, A. H. and M. Gegg (2011). "Mitochondrial contribution to Parkinson's disease pathogenesis." Parkinsons Dis **2011**: 159160.
- Schapira, A. H. and P. Jenner (2011). "Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease." Mov Disord **26**(6): 1049-1055.

- Scherz-Shouval, R. and Z. Elazar (2011). "Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology." Trends Biochem Sci **36**(1): 30-38.
- Scherz-Shouval, R., E. Shvets, E. Fass, H. Shorer, L. Gil and Z. Elazar (2007). "Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4." Embo j **26**(7): 1749-1760.
- Schweichel, J. U. and H. J. Merker (1973). "The morphology of various types of cell death in prenatal tissues." Teratology **7**(3): 253-266.
- Shen, W., A. G. Henry, K. L. Paumier, L. Li, K. Mou, J. Dunlop, Z. Berger and W. D. Hirst (2014). "Inhibition of glucosylceramide synthase stimulates autophagy flux in neurons." J Neurochem.
- Simpkins, J. W. and M. Singh (2008). "More than a decade of estrogen neuroprotection." Alzheimers Dement **4**(1 Suppl 1): S131-136.
- Singer, T. P. and R. R. Ramsay (1990). "Mechanism of the neurotoxicity of MPTP. An update." FEBS Lett **274**(1-2): 1-8.
- Small, B. J., K. S. Rawson, C. Martin, S. L. Eisel, C. D. Sanberg, C. L. McEvoy, P. R. Sanberg, R. D. Shytle, J. Tan and P. C. Bickford (2014). "Nutraceutical intervention improves older adults' cognitive functioning." Rejuvenation Res **17**(1): 27-32.
- Sorensen, P. M., R. E. Jacob, M. Fritzsche, J. R. Engen, W. M. Briehner, G. Charras and U. S. Eggert (2012). "The natural product cucurbitacin E inhibits depolymerization of actin filaments." ACS Chem Biol **7**(9): 1502-1508.
- Sriram, K., J. M. Matheson, S. A. Benkovic, D. B. Miller, M. I. Luster and J. P. O'Callaghan (2002). "Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease." FASEB J **16**(11): 1474-1476.
- Stacy M, D. T. L., Heath S. (2009). "The clinicians' and nurses' guide to Parkinson's disease." Medscape Education Retrieved February 8, 2012, from <http://www.medscape.org/viewarticle/701955>.
- Stayte, S. and B. Vissel (2014). "Advances in non-dopaminergic treatments for Parkinson's disease." Front Neurosci **8**: 113.
- Stoll, E. A., W. Cheung, A. M. Mikheev, I. R. Sweet, J. H. Bielas, J. Zhang, R. C. Rostomily and P. J. Horner (2011). "Aging neural progenitor cells have decreased mitochondrial content and lower oxidative metabolism." J Biol Chem **286**(44): 38592-38601.

- Su, H. and X. Wang (2011). "p62 Stages an interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in the heart of defense against proteotoxic stress." Trends Cardiovasc Med **21**(8): 224-228.
- Sun, X., Y. B. Cao, L. F. Hu, Y. P. Yang, J. Li, F. Wang and C. F. Liu (2011). "ASICs mediate the modulatory effect by paeoniflorin on alpha-synuclein autophagic degradation." Brain Res **1396**: 77-87.
- Tannin-Spitz, T., M. Bergman and S. Grossman (2007). "Cucurbitacin glucosides: antioxidant and free-radical scavenging activities." Biochem Biophys Res Commun **364**(1): 181-186.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur and J. Telser (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.
- van der Marck, M. A., B. R. Bloem, G. F. Borm, S. Overeem, M. Munneke and M. Guttman (2013). "Effectiveness of multidisciplinary care for Parkinson's disease: a randomized, controlled trial." Mov Disord **28**(5): 605-611.
- Virmani, A., L. Pinto, Z. Binienda and S. Ali (2013). "Food, nutrigenomics, and neurodegeneration--neuroprotection by what you eat!" Mol Neurobiol **48**(2): 353-362.
- Vogiatzi, T., M. Xilouri, K. Vekrellis and L. Stefanis (2008). "Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells." J Biol Chem **283**(35): 23542-23556.
- Wang, Y., R. Han, Z. Q. Liang, J. C. Wu, X. D. Zhang, Z. L. Gu and Z. H. Qin (2008). "An autophagic mechanism is involved in apoptotic death of rat striatal neurons induced by the non-N-methyl-D-aspartate receptor agonist kainic acid." Autophagy **4**(2): 214-226.
- Yamamoto, A., Y. Tagawa, T. Yoshimori, Y. Moriyama, R. Masaki and Y. Tashiro (1998). "Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells." Cell Struct Funct **23**(1): 33-42.
- Yan, J. (2014). "Interplay between HDAC6 and its interacting partners: essential roles in the aggresome-autophagy pathway and neurodegenerative diseases." DNA Cell Biol **33**(9): 567-580.
- Zaidi, A. U., J. S. McDonough, B. J. Klocke, C. B. Latham, S. J. Korsmeyer, R. A. Flavell, R. E. Schmidt and K. A. Roth (2001). "Chloroquine-induced neuronal cell death is p53 and Bcl-2 family-dependent but caspase-independent." J Neuropathol Exp Neurol **60**(10): 937-945.

- Zerbi, V., D. Jansen, M. Wiesmann, X. Fang, L. M. Broersen, A. Veltien, A. Heerschap and A. J. Kiliaan (2014). "Multinutrient diets improve cerebral perfusion and neuroprotection in a murine model of Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **35**(3): 600-613.
- Zhang, T., J. Li, Y. Dong, D. Zhai, L. Lai, F. Dai, H. Deng, Y. Chen, M. Liu and Z. Yi (2012). "Cucurbitacin E inhibits breast tumor metastasis by suppressing cell migration and invasion." Breast Cancer Res Treat **135**(2): 445-458.
- Zhang, T., Y. Li, K. A. Park, H. S. Byun, M. Won, J. Jeon, Y. Lee, J. H. Seok, S. W. Choi, S. H. Lee, J. Man Kim, J. H. Lee, C. G. Son, Z. W. Lee, H. M. Shen and G. M. Hur (2012). "Cucurbitacin induces autophagy through mitochondrial ROS production which counteracts to limit caspase-dependent apoptosis." Autophagy **8**(4): 559-576.
- Zhang, W., P. Li, X. Hu, F. Zhang, J. Chen and Y. Gao (2011). "Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the brain: metabolism and neuroprotection." Front Biosci (Landmark Ed) **16**: 2653-2670.