

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>iii</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....</b>	<b>viii</b>
<b>CHAPITRE I</b>	
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1    La maladie de Parkinson.....	2
1.1.1    Diagnostic .....	5
1.1.2    Prévalence génétique de la MP .....	5
1.1.3    Épidémiologie.....	7
1.1.4    Pathogenénèse.....	9
1.1.5    Neuro-inflammation.....	14
1.1.6    Traitement.....	15
1.2    L'autophagie .....	18
1.2.1    La macroautophagie.....	19
1.2.2    Les marqueurs d'autophagie utilisés .....	19
1.2.3    La microautophagie .....	21
1.2.4    L'autophagie médiée par les chaperons (CMA) .....	22
1.2.5    Le rôle de l'autophagie dans la MP .....	22
1.3    L'oleeuropéine.....	23
1.3.1    Introduction.....	23
1.3.2    Biodisponibilité.....	23
1.3.3    Effets pharmacologiques.....	24
1.4    Modèles expérimentaux.....	25
1.4.1    Cellules PC12 .....	25
1.4.2    Hydroxydopamine (6-OHDA).....	26
1.5    Objectifs.....	27

<b>CHAPITRE II</b>	
<b>LES PROPRIÉTÉS NEUOPROTECTRICES ET AUTOPHAGIQUES DE L'OLEUROpéINE SUR DES NEURONES DOPAMINERGIQUES SOUMIS À UN STRESS OXYDATIF .....</b>	<b>29</b>
2.1 Contribution des auteurs .....	29
2.2 Résumé de l'article .....	29
2.3 Article scientifique.....	31
Abstract.....	32
Introduction.....	33
Materials and methods.....	34
Drugs and chemicals .....	34
Cell culture and treatments .....	34
Cytotoxicity Measurements .....	35
DNA Fragmentation Analysis .....	35
Detection of Mitochondrial •O <sub>2</sub> – .....	36
Detection of autophagic vacuoles by Cyto-ID.....	36
Fluorescence Microscopy .....	37
Electrophoresis and Immunoblot Analysis .....	38
Statistical analysis.....	38
Results .....	39
Oleuropein reduces 6-OHDA induced cellular death and oxidative stress.....	39
Oleuropein modulates the autophagic flux .....	39
Oleuropein reverts abnormal relocalization of lysosomes and mitochondria induced by 6-OHDA.....	40
Discussion.....	41
Acknowledgments .....	43
References.....	43
Legends to the figures.....	48
Figures .....	50
<b>CHAPITRE III</b>	
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>56</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>66</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure</b>		<b>Page</b>
1.1	Schéma représentant la différence de pigmentation de la substance noire chez un sujet normal et chez un patient parkinsonien.....	3
1.2	Les circuits en jeu dans la MP .....	4
1.3	Triade symptomatique de la MP .....	4
1.4	Les protéines mal repliées, leur agrégation et leur implication dans les maladies neurodégénératives .....	10
1.5	Corps de Lewy .....	12
1.6	La balance entre les capacités antioxydantes et les ERO .....	13
1.7	Les liens possibles entre les processus de neuroinflammation et les dommages oxydatifs sur les neurones dopaminergiques dans la MP .....	15
1.8	Types d'autophagie dans la cellule.....	18
1.9	Schéma représentant la fonction de HDAC dans le processus de l'autophagie; son association avec l'ubiquitine, son interaction avec le cytosquelette et sa régulation de la maturation des autophagosomes, ainsi que le rôle de LC3 dans la formation des phagophores .....	20
1.10	Représentation schématique du rôle de p62 dans la voie de l'autophagie indiquant la relation entre LC3 et p62 et la dégradation de cette dernière par les autophagolysosomes.....	21
1.11	Structure chimique de l'Oleuropeïne .....	23
1.12	PC12 différentiées.....	26
1.13	Structure chimique de la 6-OHDA .....	26
1.14	Mécanismes d'action proposés pour la mort cellulaire des PC12 induite par la 6-OHDA.....	27

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

6-OHDA	6-hydroxydopamine
ATP	Adénosine triphosphate
Baf	Bafilomycine A1
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CMA	Autophagie médiée par les chaperones
COMT	Catéchol-O-méthyltransférase
DA	Dopamine
DAT	Dopamine Active transporter
DDC	Diéthyledithiocarbamate
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
HDAC6	Histone déacétylase 6
HSP	Heat shock proteins
IMAO	Inhibiteurs de la monoamine oxydase
IRM	Imagerie par résonnance magnétique
LAMP2	Lysosome-associated membrane protein 2
LC3	« Light-chain-3 », protéine marqueur de l'autophagie
LDH	Lactate déshydrogénase
MP	Maladie de Parkinson
MPTP	1 - méthyle 4 - phényl 1,2,3,6-tétrahydro pyridine
NGF	Nerve growth factor
Oe	Oleuropéine
PE	Phosphatidyl- éthanolamine
PET	Tomographie par Émission de Positrons
PINK1	« PTEN-induced putative kinase-1 », kinase putative induite par PTEN-1
ssDNA	Single Strand DNA
SOD	Superoxyde dismutase
SNARE	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor
SNpc	Substance noire <i>pars compacta</i>

## **CHAPITRE I**

### **INTRODUCTION**

Neurodégénération, Alzheimer, Parkinson, sclérose en plaques... des mots qui sont malheureusement devenus courants et pas seulement pour les spécialistes, mais aussi chez le grand public. En effet, en entendant ces termes, beaucoup d'entre nous pensent à un proche que ça soit un grand parent, un ami de la famille, un frère ou une sœur qui font face ou qui ont donné leur vie après une lutte contre une maladie neurodégénérative. Effectivement, la prévalence de ces pathologies est en constante progression avec le vieillissement de la population. Ce qui est inquiétant, puisqu'en 2011, la première vague de baby-boomers qui représente la plus grande cohorte démographique de l'humanité a atteint l'âge de 65 ans. Et malheureusement, les chiffres ne font qu'alimenter cette inquiétude. En 2010, près d'un demi-million de Canadiens étaient atteints de maladies neurodégénératives. Avec le vieillissement de la population, d'ici une génération, le nombre de cas doublera pour atteindre 1,1 million de personnes (Ford 2009). Ces statistiques alarmantes nous poussent de plus en plus autant que chercheurs à essayer de trouver le moyen de prévenir ou guérir ces maladies puisque la médecine d'aujourd'hui ne prodigue que des traitements symptomatiques ou palliatifs. C'est le cas dans notre laboratoire qui depuis des années a pour objectif de trouver des molécules naturelles capables de prévenir la dégénérescence neuronale typique de la MP. Cette pathologie est la deuxième maladie neurodégénérative la plus répandue. Elle se caractérise par des troubles moteurs dont les plus courants sont des tremblements, une rigidité musculaire, ainsi qu'une lenteur des mouvements. Ces symptômes sont la conséquence de plusieurs atteintes neurologiques dont l'origine se situe dans la perte de neurones dopaminergiques de la substance noire du mésencéphale.

Plusieurs molécules naturelles, dont des phytoestrogènes ou des phytostérols, ont été mises à l'épreuve dans les laboratoires de recherche du monde entier, et ceci, dans le but d'étudier leurs effets sur un modèle dégénératif de neurones en culture. Beaucoup de ces molécules ont montré des effets antioxydants ou anti-inflammatoires. Par le biais de plusieurs études récentes, nous savons qu'il existe un lien entre le stress oxydant, l'inflammation et la neurodégénérescence. Par conséquent, ces molécules pourraient agir autant que neuroprotecteurs.

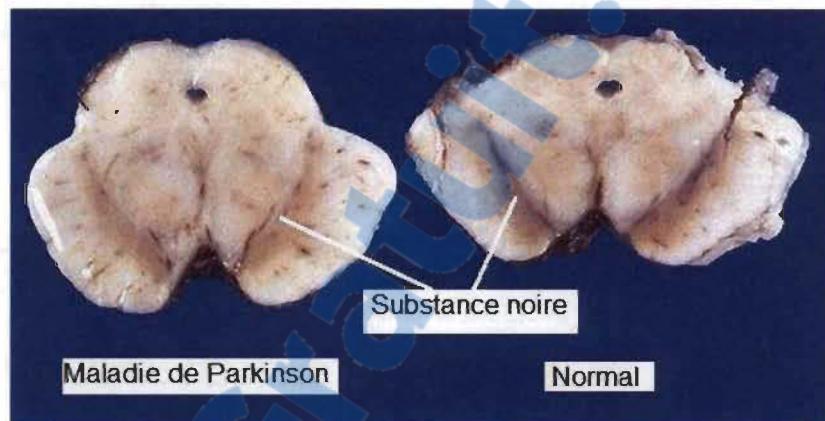
Dans cette étude, la molécule qui a suscité notre intérêt est un polyphénol extrait des feuilles de l'olivier, l'Oe. Ce mémoire se compose d'un article prêt à être soumis montrant et discutant les effets neuroprotecteurs et autophagiques de l'Oe. Mais tout d'abord, les pages qui suivront seront destinées à mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la MP.

## 1.1 La maladie de Parkinson

Commençons par un bref historique de la maladie. Cette dernière doit son nom au médecin anglais James Parkinson. Il fut le premier à avoir décrit la maladie en 1817 dans un court mémoire intitulé : « An Essay on the Shaking Palsy ». Dans son ouvrage, il décrit les symptômes qu'il avait observés et mentionne principalement des tremblements involontaires ainsi qu'une diminution de la force musculaire. Par la suite, le neurologue français Jean Martin Charcot ajoute la rigidité musculaire au tableau des symptômes et propose de l'appeler « maladie de Parkinson » au lieu de « paralysie agitante » (Vanderheyden 2012).

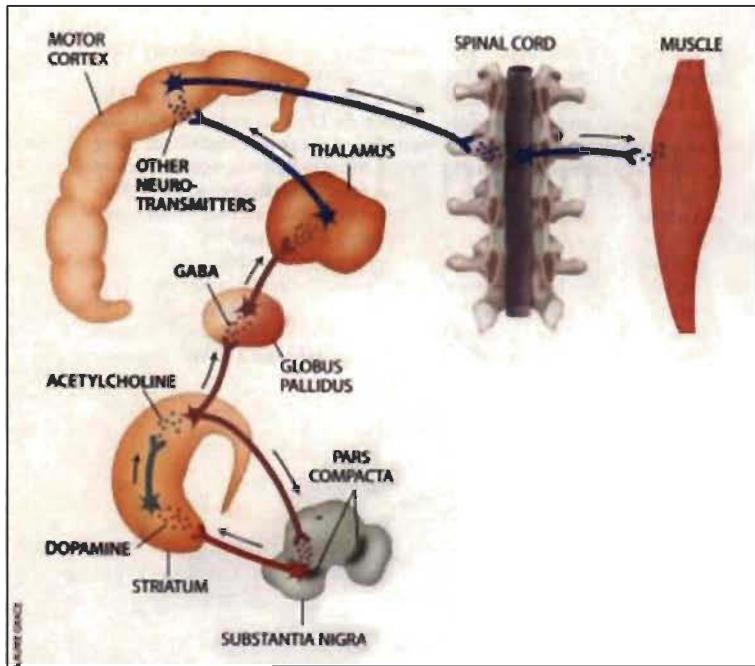
Ces dernières années, la recherche sur la MP a pris un essor considérable. Les connaissances ont été beaucoup plus approfondies que cela soit par rapport à sa physiopathologie, son diagnostic ou sa symptomatologie. La MP est une maladie neurodégénérative liée à une perte progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire du mésencéphale (Figure 1.1), ce qui résulte en une dénervation dopaminergique massive du striatum (Figure 1.2). Ce dernier avec les neurones

dopaminergiques de la substance noire fait partie d'un système complexe appelé ganglions de la base. Le rôle de ce système est de traiter les informations motrices qui viennent du cerveau via le striatum et ainsi de gérer les mouvements. Ce dysfonctionnement explique les symptômes moteurs observés chez les patients parkinsoniens mieux connus sous le nom de triade symptomatique parkinsonienne et qui se manifeste par des tremblements au repos, une rigidité et une akinésie (Figure 1.3).



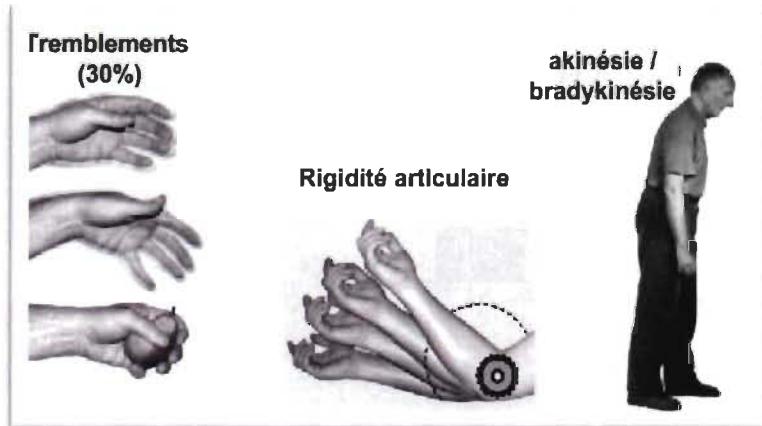
**Figure 1.1** Schéma représentant la différence de pigmentation de la substance noire chez un sujet normal et chez un patient parkinsonien. (Tirée de <https://teddybrain.wordpress.com>)

Cependant, les sujets parkinsoniens peuvent également faire face à des symptômes non moteurs. Bien qu'on en parle peu ou qu'on leur donne une moindre importance devant la triade symptomatique parkinsonienne, ces symptômes ont souvent tendance à altérer la qualité de vie des patients. Ils peuvent être dus à des lésions neuropathologiques qui commencent dans le noyau dorsal du vague, dans le bulbe olfactif et le noyau olfactif antérieur, et qui vont progressivement « remonter » dans les structures sus-jacentes (Wolters 2006). Les plus fréquents sont d'ordre neuropsychiatriques et digestifs, on note également des problèmes de sommeil, sensoriels ou encore des dysfonctionnements du système nerveux autonome (Lepage 2012).



**Figure 1.2** Les circuits en jeu dans la MP. (Tirée de <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/neurobioquimica/parkinson.htm>)

Parmi les manifestations d'ordre neuropsychiatrique, on remarque que les troubles cognitifs ou dépressifs prennent le devant de la scène. Les troubles cognitifs se traduisent dans la plupart du temps par une perte de rendement intellectuel ainsi que d'un déclin mnésique (Defebvre 2011). Quant au syndrome dépressif, il se manifeste chez le patient par une tristesse, un pessimisme et une péjoration de l'avenir.



**Figure 1.3** Triade symptomatique de la MP. (Tirée de <http://python.sm.u-bordeaux2>)

### 1.1.1 Diagnostic

Il peut être difficile d'établir le diagnostic de la MP dans ses débuts, et ceci, en raison des points communs qu'elle partage avec les autres syndromes parkinsoniens. En effet, ces derniers sont aussi caractérisés par une atteinte de la substance noire, et ils peuvent dans leurs premiers mois ou même leurs premières années d'évolution paraître comme la MP. La démence à corps de Lewy est un exemple de syndrome parkinsonien (Defebvre 2011).

Afin d'établir un diagnostic fiable et précoce de la maladie, l'*United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain* a développé des critères qui proposent un diagnostic clinique en trois étapes, il se base sur une combinaison de symptômes principaux (tremblement, akinésie et rigidité), l'exclusion d'autres causes de syndromes parkinsoniens, et finalement, il faut qu'il y ait trois ou plus de critères positifs potentiels propices à la MP, parmi eux : une excellente réponse à la lévodopa (Hughes 1992), un médicament que sera traité à la sous-section 1.1.6 de ce mémoire.

Le scanner X et l'IRM ne sont pas très utiles dans le diagnostic de la MP, ils sont surtout demandés en cas de syndrome parkinsonien de présentation atypique. Donc leur but principal est de différencier entre la MP et les syndromes parkinsoniens.

### 1.1.2 Prévalence génétique de la MP

Concernant les facteurs génétiques (moins de 5 %), plusieurs gènes ont été identifiés comme étant impliqués dans des formes rares monogéniques de la MP, par exemple : parkine et PINK1 (Nalls 2011). Les mutations du gène codant pour parkine causent une forme autosomique récessive de la MP. Cette forme a été individualisée au Japon sous le nom de parkinsonisme juvénile autosomique récessif puisqu'elle était caractérisée par un début précoce (souvent avant l'âge de 20 ans) (Dürr 2000). Cependant, il est maintenant connu que ce syndrome n'est pas toujours de début juvénile ou précoce (Lincoln 2003). Les symptômes de ce syndrome incluent une dystonie des

membres inférieurs, des réflexes vifs, une amélioration nette par le sommeil, ainsi qu'une excellente réactivité à la lévodopa associée à la survenue précoce de dyskinésies. Parkine est une protéine qui comporte 465 acides aminés, son étude révèle la présence de deux motifs. Le premier, à l'extrémité N-terminale de la protéine, montre une homologie modérée avec l'ubiquitine, et le second, dans la moitié C-terminale, consiste en un domaine RING-IBR-RING. Il a été démontré récemment que parkine fonctionne comme une ubiquitine ligase E3. Un composant du système ubiquitine-protéasome qui identifie et cible les protéines mal repliées au protéasome pour dégradation (Dürr 2000).

Quant à PINK1, c'est une protéine qui contient 581 acides aminés et est constitué d'un motif de ciblage mitochondrial N-terminal, un domaine transmembranaire, un domaine kinase Ser/Thr et un domaine C-terminal autorégulateur. La mutation de PINK1 cause une forme précoce et familiale de MP, appelée « maladie de Parkinson de type 6 » ou PARK6. Dans les mitochondries, PINK1 est exprimé dans l'espace intermembranaire mitochondrial, membranes mitochondrielles internes et externes. PINK1 a comme rôle de maintenir les fonctions mitochondrielles normales dans les neurones dopaminergiques de la substance noire, et d'exercer un effet neuroprotecteur. Une mutation de PINK1 cause donc une altération des mitochondries des neurones dopaminergiques et la perte de l'effet neuroprotecteur, ce qui conduit ensuite à la neurotoxicité des neurones dopaminergiques (Jones 2010, Wang 2011, Narendra 2012, Kazlauskaite 2015).

En 1997, le gène de l'alpha-synucléine a été le premier mis en évidence dans une forme familiale de Parkinson de transmission autosomique dominante (Polymeropoulos MH1 1997). Jusqu'à présent, trois mutations ont été mises en évidence : A30P, E46K et A53T. Les patients porteurs de ces mutations présentent une MP sévère dont le début se situe entre 40 et 60 ans (Corti 2003). Ce gène sera analysé plus en profondeur dans la sous-sous-section 1.1.4.1 de ce mémoire.

### 1.1.3 Épidémiologie

#### 1.1.3.1 *Prévalence*

La prévalence de la MP dans les pays industrialisés est généralement estimée à 0,3 % de toute la population et environ 1 % chez les personnes de plus de 60 ans (Nussbaum 2003, De Lau 2006). Les plus basses valeurs sont observées dans les pays africains et les plus hautes dans les pays occidentaux. En effet, la MP est 2 à 5 fois plus fréquente dans les pays industrialisés que dans les pays en voie de développement (Zhang 1993). L'apparition de la MP est rare avant l'âge de 50 ans. Cependant, il est clair que c'est une pathologie liée à l'âge puisque sa prévalence augmente avec le vieillissement (De Lau 2006). La plupart des études montrent que la prévalence de la MP est similaire chez les hommes et chez les femmes ou une légère prédominance masculine (Tanner 1992). Les effets neuroprotecteurs des œstrogènes ont été suggérés comme une explication possible pour un risque plus élevé chez les hommes que chez les femmes, mais leur rôle est encore controversé (Saunders-Pullman 2003, De Lau 2006).

#### 1.1.3.2 *Incidence*

Une méta-analyse a été réalisée en 2003, et ceci, en réunissant des études menées à travers le monde sur la MP avec des méthodes adaptées. Selon les auteurs, l'incidence approximative de la maladie serait de 17 cas pour 100 000 habitants par an, augmentant avec l'âge, avec un pic entre 70 et 79 (Twelves 2003).

#### 1.1.3.3 *Étiologie*

L'étiologie de la MP idiopathique demeure inconnue à ces jours. Cependant, des facteurs environnementaux ont été suggérés parmi les hypothèses étiologiques.

Celle du facteur environnemental a été très étudiée depuis la découverte en 1983 d'un syndrome parkinsonien chez les toxicomanes. En effet, plusieurs personnes ont développé des signes typiques de MP à la suite d'injection intraveineuse accidentelle

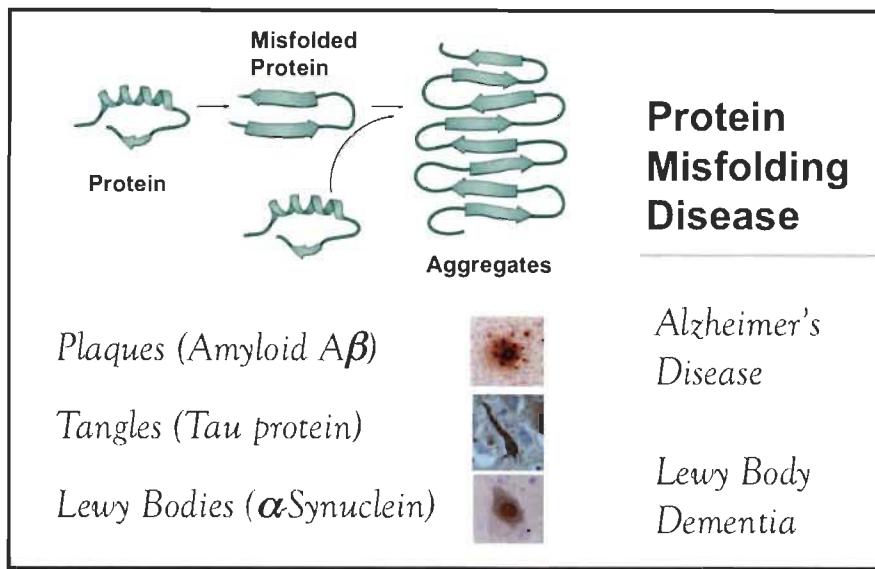
d'un dérivé de l'héroïne, la 1- méthyl-4-phényl-1,2,4,6-tétrahydropyridine ou MPTP (Davis 1979). De plus, le métabolite actif du MPTP a été utilisé comme herbicide pendant quelques années à la fin des années 1960, par conséquent, des substances utilisées comme pesticides, herbicides et insecticides évoquées comme substances neurotoxiques « MPTP-like » pourraient être impliquées dans le développement de la MP. Certains pesticides auraient une action neurotoxique directe, soit en perturbant le transport de la dopamine, soit en provoquant une faillite de la chaîne respiratoire mitochondriale, soit encore en entraînant des perturbations enzymatiques plus diffuses par un stress oxydatif (Defebvre 2011). Quant à l'action indirecte, par exemple, un polymorphisme du gène codant pour le complexe enzymatique du cytochrome P450 pourrait causer un déséquilibre fonctionnel des systèmes enzymatiques de détoxicification, perturbant le métabolisme des substances neurotoxiques environnementales (Benitez 1990).

Récemment, des recherches ont démontré qu'il y avait une relation inverse entre la consommation de tabac, café et la MP. Un effet neuroprotecteur du tabac a été suggéré, la plupart des explications probables impliquent la nicotine, cette dernière peut stimuler la libération de dopamine, agir comme un antioxydant, ou modifier l'activité de la monoamine oxydase B (Quik 2004, De Lau 2006). Effectivement, la nicotine pourrait agir en stimulant les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine. De nombreuses voies de signalisation sont modifiées en réponse à l'activation de ce récepteur, y compris les voies synaptiques impliquées dans le contrôle de la libération de neurotransmetteurs incluant la dopamine. Chez les consommateurs de café, c'est la caféine qui a démontré un certain effet protecteur contre la MP. La caféine est un inhibiteur du récepteur d'adénosine A2. Les récepteurs de l'adénosine sont colocalisés autant qu'hétéromères avec les récepteurs dopaminergiques D2, inhibant les effets de la transmission dopaminergique. La caféine améliore les déficits moteurs en levant l'inhibition pré et post synaptique que l'adénosine impose sur la transmission synaptique (Ross 2000, De Lau 2006, Ferre 2008, Ribeiro 2010, Postuma 2012).

Après les nombreuses recherches et les importantes avancées qui ont été réalisées afin de mieux comprendre l'origine de la MP, deux hypothèses ont été suggérées. La première hypothèse est d'ordre génétique, elle propose que l'agrégation anormale de protéines, essentiellement la synucléine, joue un rôle important dans la dégénérescence des neurones. L'autre hypothèse implique le rôle du stress oxydatif et celui du dysfonctionnement mitochondrial dans la perte des neurones de la *substantia nigra*. Ces hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives, et il est possible d'envisager un scénario de la mort des neurones dopaminergiques qui prend en compte les deux hypothèses citées ci-haut (Przedborski 2003, Defebvre 2011).

#### 1.1.4 Pathogenèse

Bien que les mécanismes sous-jacents de la neurodégénérescence demeurent obscurs, il a été établi que le cerveau de la plupart des patients décédés de maladies neurodégénératives contient des dépôts de protéines anormales (Kajava 2013) (Figure 1.4). Les neurones possèdent trois systèmes d'élimination des protéines de conformation anormale : les heat shock proteins (HSP), le système ubiquitine-protéasome et le système de dégradation impliquant les lysosomes. Dans des conditions physiologiques, ces trois systèmes permettent d'éviter l'accumulation de ces protéines de conformation anormale. Cependant, il arrive que dans des circonstances pathologiques, les systèmes d'élimination soient débordés, ce qui provoque l'accumulation de protéines de conformation anormale jusqu'à atteindre un niveau critique et finalement s'agréger.



**Figure 1.4** Les protéines mal repliées, leur agrégation et leur implication dans les maladies neurodégénératives. (Tirée de <http://www.ipd.uw.edu/the-three-dreamer-protein-design-partnership-for-alzheimers-disease/>)

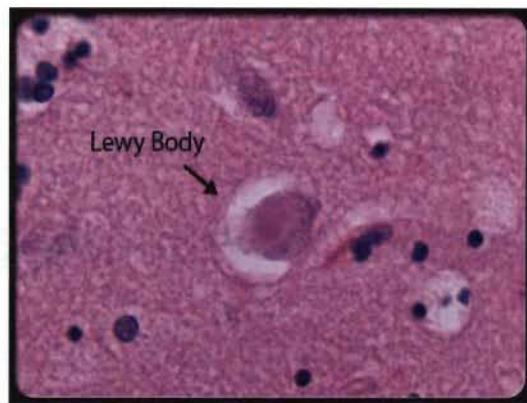
#### 1.1.4.1 L'alpha synucléine

L'alpha-synucléine est une protéine neuronale présynaptique de 140 acides aminés qui est liée génétiquement et de façon neuropathologique à la MP. Elle peut en effet contribuer à la pathogenèse de la MP en adoptant généralement des conformations aberrantes d'oligomères solubles, appelées protofibrilles, ces derniers sont les espèces toxiques qui interviennent dans la perturbation de l'homéostasie cellulaire et la mort des neurones, par leurs effets sur différentes cibles intracellulaires, y compris la fonction synaptique. L'alpha-synucléine est abondamment exprimée dans le système nerveux, comprenant 1 % des protéines cytosoliques totales (Stefanis 2012). Elle est présente dans les terminaisons synaptiques et au moins 50 % sont liés aux vésicules synaptiques. Sa fonction précise demeure encore inconnue, mais des travaux ont démontré son implication dans la modulation de la transmission synaptique, dans la synthèse de la dopamine, dans les voies de signalisation intracellulaires essentielles à la survie et à la trophicité neuronale ainsi que dans la régulation du transporteur de la dopamine (Norris 2004).

Il est suggéré que la protéine mutée ou produite en excès pourrait acquérir une nouvelle fonction toxique en s'assemblant sous la forme de fibrilles insolubles de type amyloïde, et provoquer une neurodégénérescence. Cependant, dans le processus de formation des fibrilles, différentes formes intermédiaires d'alpha-synucléine se développent. Ce sont d'abord des formes oligomériques solubles d'alpha-synucléine qui adoptent des structures sphériques, d'anneau ou de chaîne, lorsque vues sous un microscope électronique. Ces structures, appelées protofibrilles, deviennent progressivement insolubles et se transforment en fibrilles (Stefanis 2012).

En se basant sur le rôle qu'a à jouer l'alpha-synucléine au niveau de la synapse, des chercheurs se sont penchés sur le sujet. En effet, des études ont identifié des effets synaptiques comme des déterminants importants de la neurotoxicité de l'alpha-synucléine sur la base de la surexpression de la protéine, et ceci en culture cellulaire et dans des modèles *in vivo*. Les effets observés comprennent la perte de protéines synaptiques, diminution de la libération de neurotransmetteurs, la redistribution des protéines SNARE, l'élargissement des vésicules synaptiques, et l'inhibition de recyclage des vésicules synaptiques (Chung 2009, Garcia-Reitbock 2010, Nemanic 2010, Scott 2010, Stefanis 2012).

Il est donc maintenant évident que l'alpha-synucléine agit par un gain de fonction toxique, et la mise en évidence d'agrégats anormaux d'alpha-synucléine comme composants majeurs des inclusions intracellulaires appelés corps de Lewy a renforcé l'hypothèse (Spillantini 1997). Les corps de Lewy sont des inclusions cytoplasmiques formées d'agrégats anormaux de protéines, essentiellement la synucléine, mais aussi de parkine, d'ubiquitine et de neurofilaments. Les corps de Lewy ont un diamètre de plus de 15 µm et ils ont une structure organisée contenant un noyau hyalin dense entouré d'un halo clair (Figure 1.5) (Przedborski 2003). Leur accumulation mène à une neurodégénérescence. Ces derniers sont considérés comme marqueurs histologiques de la MP si présent dans le mésencéphale.



**Figure 1.5** Corps de Lewy. (Tirée de <http://www.medicinenet.com/>)

Il a aussi été démontré dans des lignées neuronales, et *in vivo* chez le rat et le bovin, que les inhibiteurs du complexe I de la chaîne respiratoire augmenteraient l'expression de la synucléine et sa capacité à former des agrégats (Dawson 2003).

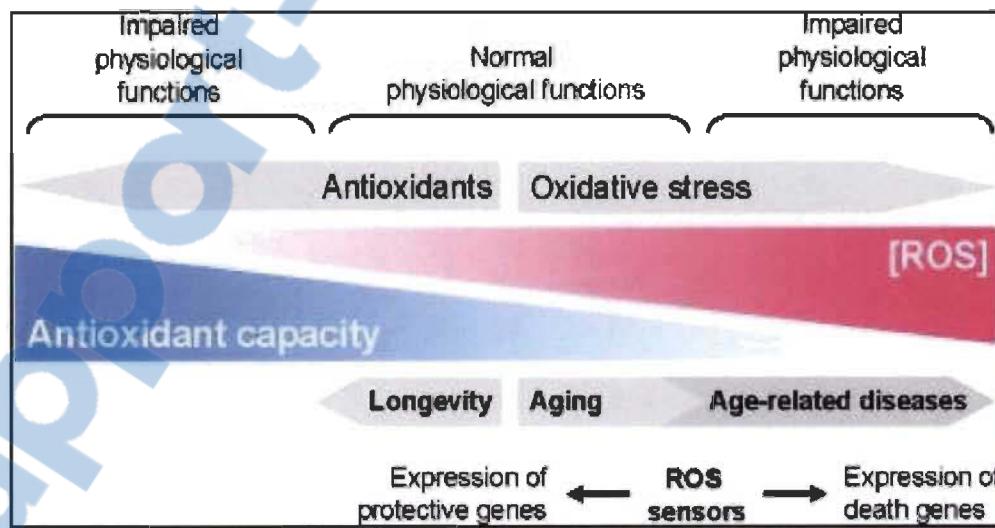
#### 1.1.4.2 *Stress oxydatif*

En 1956, le Dr Denham Harman exposa une théorie qui bouleversa la compréhension des mécanismes de vieillissement, il devint de ce fait un pionnier dans ce domaine. Il s'agit de « la théorie radicalaire du vieillissement », selon laquelle le vieillissement serait provoqué par des dommages oxydatifs induits par des ERO au niveau moléculaire (Bonnefont-Rousselot 2007).

Les ERO peuvent être produites par des agents physiques comme les rayonnements, des réactions chimiques et surtout enzymatiques. En effet, toute réaction impliquant de l' $O_2$  et un système réducteur de transfert d'électrons est susceptible de libérer des ERO. La mitochondrie représente donc la principale source d'oxydants puisque la quasi-totalité de l'oxygène est consommée par la chaîne respiratoire mitochondriale et la dysfonction ou l'inhibition de celle-ci entraîne la formation d'ERO qui produit des lésions cellulaires en réagissant avec les acides nucléiques, certains lipides et protéines (Valko 2007, Defebvre 2011). Le peroxyde d'hydrogène et l'oxyde nitrique sont des exemples d'ERO. Lorsque l'oxydation des nutriments est inefficace, dans la mitochondrie le ratio de production d'ATP/consommation d'oxygène est faible,

ce qui résulte en une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène. Ces dernières avec des facteurs génétiques, le vieillissement ainsi qu'une biogénèse mitochondriale réduite contribuent au dysfonctionnement des mitochondries. Et on sait maintenant que la dysfonction mitochondriale représente l'un des mécanismes pathogéniques cruciaux de la MP. Des mutations dans des gènes tels que Parkin et PINK1 causent des formes autosomiques récessives de MP et ont été impliquées dans le contrôle de la morphologie et de la fonction mitochondriale (Banerjee 2010). Ces gènes ont été présentés plus en détail à la sous-section 1.1.2 de ce mémoire.

La production d'ERO ne constitue pas une situation pathologique puisque l'organisme possède un système de détoxification contre les ERO faisant intervenir des enzymes comme la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase. Le stress oxydatif peut devenir un état physiopathologique à la suite d'un déséquilibre entre la production des ERO et les défenses de l'organisme (Figure 1.6), plus précisément un excès d'ERO ou une insuffisance de la quantité des enzymes antioxydantes.



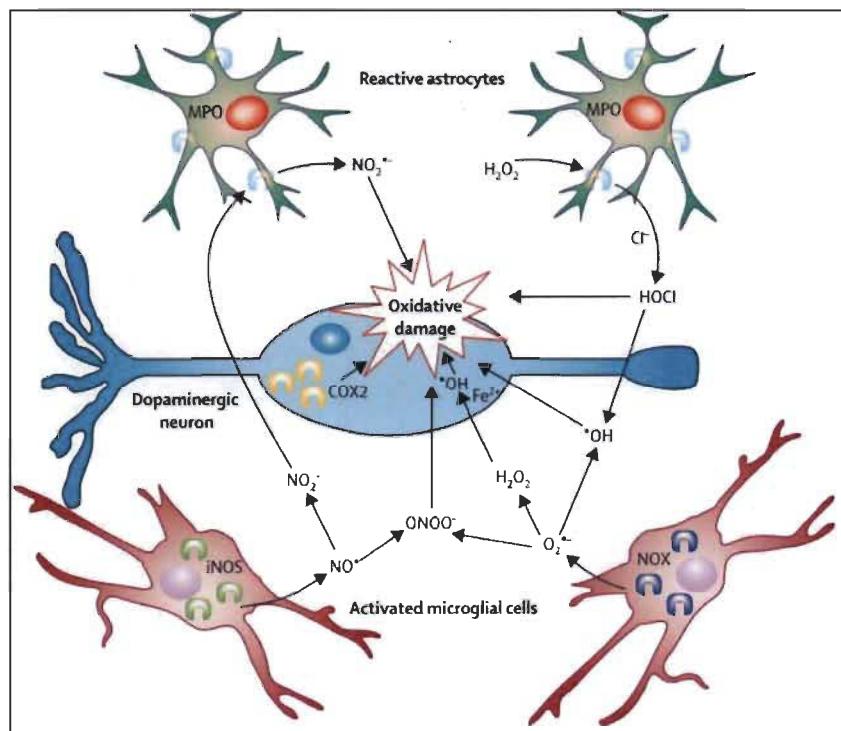
**Figure 1.6** La balance entre les capacités antioxydantes et les ERO. (Tirée de P. Storz. « Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress ». Antioxid Redox Signal 14(4) (2011): 593-605).

Déjà en 1987, il a été démontré que la molécule toxique MPTP, responsable de syndromes parkinsoniens sévères, agit en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire (Nicklas 1987). Des travaux ultérieurs ont montré que les ERO étaient impliqués dans la physiopathologie de la MP et qu'il existait une diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire (Greenamyre 2001). De plus, plusieurs facteurs renforcent l'hypothèse de l'implication du stress oxydatif dans la pathogénèse de la MP, parmi eux : la forte tendance de la dopamine à s'auto-oxyder, les ERO produits durant cette réaction, ainsi que la forte concentration de fer qui agit comme catalyseur des réactions d'oxydation retrouvée dans la région de la SNpc des parkinsoniens (Jenner 1992).

### 1.1.5 Neuro-inflammation

Il a été suggéré que les neurones dopaminergiques meurent par apoptose. En effet, des modifications immunohistochimiques caractéristiques de la mort cellulaire par apoptose ont été mises en évidence dans la substance noire de patients atteints de la MP (Michel 2002). La microglie activée, présente dans la substance noire des patients parkinsoniens, pourrait jouer un rôle clé dans ce phénomène apoptotique en libérant des composés cytotoxiques tels que des cytokines pro-apoptotiques et des radicaux libres, ces composés étant capables d'activer des voies de signalisation cellulaires intraneuronales proapoptotiques. En effet, des études récentes d'imagerie PET ont démontré que les patients parkinsoniens avaient un plus grand nombre de microglie, non seulement dans les noyaux gris centraux et dans les zones touchées aux premiers stades de la MP, mais aussi dans le cortex et d'autres régions du cerveau impliquées plus tard dans la maladie. Par conséquent, il est suggéré que des niveaux chroniquement élevés de cytokines servent à maintenir l'activation d'un nombre abondant de microglie dans le mésencéphale, permettant des réponses inflammatoires centrales prolongées qui peuvent augmenter la perméabilité de la BHE et augmenter le trafic périphérique de cellules immunitaires. Tout cela créera un environnement de stress oxydatif qui accélérera les dommages oxydatifs des neurones dopaminergiques (Lee 2009). Les mécanismes neuroinflammatoires contribuent également à la cascade d'événements conduisant à la dégénérescence neuronale. Ces mécanismes comprennent l'activation microgliale,

astrogliose, et une infiltration lymphocytaire. À la suite d'une activation appropriée, les cellules microgliales peuvent exercer une activité antimicrobienne, et induire une toxicité cellulaire par la production et la libération des ERO et de l'azote. Bien que peu réactifs, les radicaux libres NO et O<sub>2</sub><sup>-</sup> peuvent se combiner pour former des espèces hautement réactives d'azote peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) (Figure 1.7). Ces dernières peuvent causer des dommages oxydatifs dans diverses protéines, telles que la tyrosine hydroxylase et l' $\alpha$ -synucléine, et ainsi contribuer à la dégénérescence des neurones dopaminergiques (Hirsch 2009).



**Figure 1.7** Les liens possibles entre les processus de neuroinflammation et les dommages oxydatifs sur les neurones dopaminergiques dans la MP. (Tirée de Hirsch, E. C. and S. Hunot « Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? » Lancet Neurol 8(4) (2009): 382-397).

### 1.1.6 Traitement

À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement curatif pour la MP. Les médicaments utilisés sont purement symptomatiques puisqu'ils visent à compenser

le déficit dopaminergique. Dans ce mémoire, seulement les principales classes de traitement seront abordées.

- Le premier médicament révolutionnaire qui a été utilisé est la lévodopa, administré pour la première fois en 1961, il reste jusqu'à maintenant le médicament le plus fréquemment utilisé. Ce précurseur de la dopamine est absorbé essentiellement dans le duodénum et passe la barrière hémato-encéphalique selon un mécanisme de transport compétitif avec les acides aminés neutres (Defebvre 2011, Ronald 2012). Elle est ensuite captée à l'extrémité des neurones dopaminergiques nigrostriataux où elle est décarboxylée en dopamine pour être intégrée dans les vésicules synaptiques. Une fois libérée dans la fente synaptique, elle se fixe sur les récepteurs dopaminergiques D1 ou D2. L'administration de la lévodopa augmente le tonus dopaminergique striatal et améliore la triade symptomatique parkinsonienne : akinésie, rigidité et tremblements. Cependant, après quelques années de traitements, le patient fait face à des effets secondaires tels que des mouvements involontaires (dystonies), une somnolence, des troubles digestifs, des troubles cardiovasculaires et des troubles psychiques peuvent aussi être observés. La lévodopa est utilisée en combinaison avec un autre médicament qui est la Carbidopa. Ceci afin d'empêcher la dégradation de la lévodopa avant qu'elle ne franchisse le cerveau. L'ajout de la Carbidopa permet l'utilisation de faibles doses de la lévodopa, ce qui réduit le risque d'effets secondaires tels que les nausées et les vomissements (Société de Parkinson 2014).
- Les inhibiteurs de la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) peuvent avoir un effet antiparkinsonien lorsqu'associés à la lévodopa. Ils bloquent la COMT qui est une enzyme responsable du catabolisme de la lévodopa. Les inhibiteurs de COMT peuvent donc prolonger la durée d'action de la lévodopa (Société de Parkinson 2014).
- Les inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO) agissent en bloquant une autre enzyme de dégradation de la dopamine, la MAO. Ils peuvent être utilisés

seuls ou en association avec la lévodopa. Ils augmentent son effet et permettent de diminuer les fluctuations motrices associées au traitement à long terme de la lévodopa.

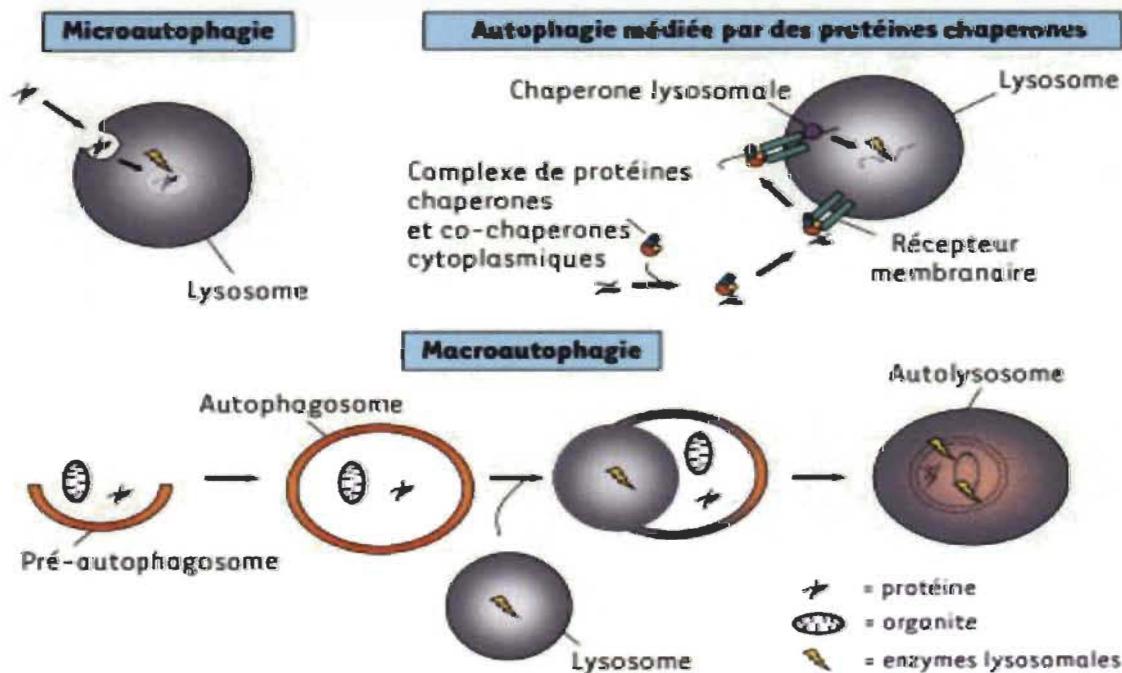
- Les agonistes dopaminergiques sont des analogues structuraux de la dopamine. Ils peuvent être utilisés comme premier traitement ou en association avec la lévodopa à des stades plus avancés, ils stimulent directement les récepteurs dopaminergiques tant centraux que périphériques. Ils ont un risque moindre que la lévodopa d'induire des dyskinésies à long terme. Cependant, ils agissent plus lentement et moins efficacement que la lévodopa. Les effets secondaires peuvent comprendre la somnolence, les hallucinations, l'enflure des jambes ainsi que des comportements obsessifs à l'égard de la nourriture, de la sexualité, de la consommation, du jeu et d'internet (Singh 2007, Defebvre 2011, Société de Parkinson 2014).
- Les anticholinergiques ont surtout été utilisés de 1950 jusqu'à la venue de la dopa-thérapie, leur mécanisme d'action est de bloquer les récepteurs muscariniques périphériques et centraux, ce qui permet de réduire les tremblements chez les patients parkinsoniens, mais l'importance des effets secondaires a restreint l'utilisation de cette classe de médicament.
- En ce qui concerne le traitement chirurgical, la stimulation cérébrale profonde est efficace contre la triade symptomatique parkinsonienne : akinésie, rigidité et tremblements (Groiss 2009). L'opération consiste à implanter deux électrodes dans une région cérébrale précise. Généralement, il s'agit du noyau sous-thalamique. Ces régions d'implantation sont déterminées grâce à un IRM préopératoire. Les électrodes sont ensuite reliées à un neuro-stimulateur. Ce dernier est implanté sous la peau au niveau de la région sous-claviculaire ou abdominale. Le neuro-stimulateur générera par la suite de faibles impulsions électriques. Cette chirurgie permet l'obtention des mêmes résultats que la lévodopa, avec des effets secondaires en moins. L'inconvénient est que c'est une chirurgie coûteuse, lourde qui comporte des risques

principalement d'hémorragie ou d'infection, ainsi que des complications neurologiques. C'est pourquoi les candidats à la chirurgie doivent répondre à des critères précis (Defebvre 2011, Chen 2013).

## 1.2 L'autophagie

L'autophagie est le processus de dégradation des constituants cellulaires endommagés ou non essentiels, médié par les lysosomes. Il est qualifié comme étant l'arbitre de la survie neuronale dans les maladies neurodégénératives. En effet, l'autophagie peut jouer un rôle critique dans la pathogénèse des maladies neurodégénératives incluant la MP, à cause de son rôle de « nettoyeur » cellulaire.

Il existe trois mécanismes distincts de l'autophagie : la macroautophagie, la microautophagie, et celle médiée par les chaperons (Figure 1.8).



**Figure 1.8** Types d'autophagie dans la cellule. (Tirée de Puyal J *et al.* The two faces of autophagy in the nervous system. Med Sci 25(4) (2009): 383-90).

### 1.2.1 La macroautophagie

La macroautophagie est responsable de la dégradation des larges protéines et les organites endommagés. Le déroulement de ce processus commence par la formation de phagophore qui est probablement dérivé de la bicouche lipidique de la membrane plasmatique, réticulum endoplasmique et/ou trans-Golgi, mitochondries ou des endosomes (Axe 2008, Ravikumar 2010). Le phagophore s'étend pour engloutir la cargaison intracellulaire comme les agrégats protéiques, et les organelles endommagés, séquestrant ainsi la cargaison dans une double membrane d'autophagosome (Mizushima 2007). Les autophagosomes sont formés aléatoirement dans le cytoplasme et transportés le long des microtubules. Une fois au centre, ils deviennent matures en fusionnant avec des endosomes précoce ou tardifs, avant de fusionner avec les lysosomes.

Le contenu autophagosomale est dégradé par protéase acide lysosomale. Les acides aminés produits durant la dégradation sont ensuite transportés par les perméases lysosomale et les transporteurs au cytoplasme afin d'être récupérés.

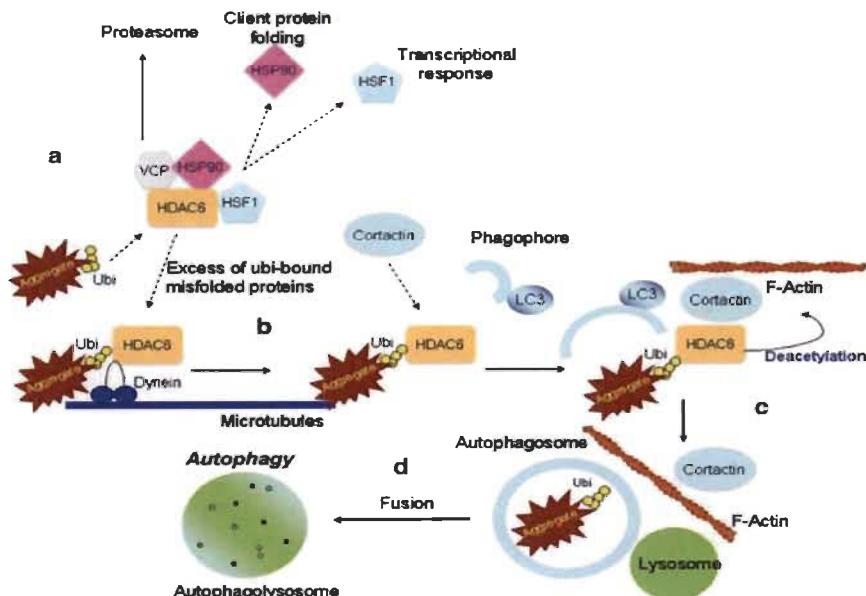
### 1.2.2 Les marqueurs d'autophagie utilisés

Le mécanisme d'autophagie a pris un essor considérable ces dernières années, ce qui a donné naissance à plusieurs recherches sur le développement de tests fiables et pertinents, et ceci dans le but de pouvoir bien suivre ce processus et ainsi mieux le comprendre. Bien qu'il existe plusieurs méthodes, dans les lignes qui suivent, ce sont les marqueurs qui ont été utilisés durant ce projet de maîtrise qui vont être abordés et détaillés.

- LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) est une protéine d'environ 17 kDa, elle est retrouvée de façon ubiquitaire dans les tissus des mammifères ainsi que dans les cellules en culture. LC3-I, une forme cytosolique de LC3, subit une suite de modifications post-transcriptionnelles aboutissant à la liaison d'un phosphatidyl-éthanolamine (PE), ce qui lui permet de s'incorporer dans la membrane du pré-autophagosome. Cette forme

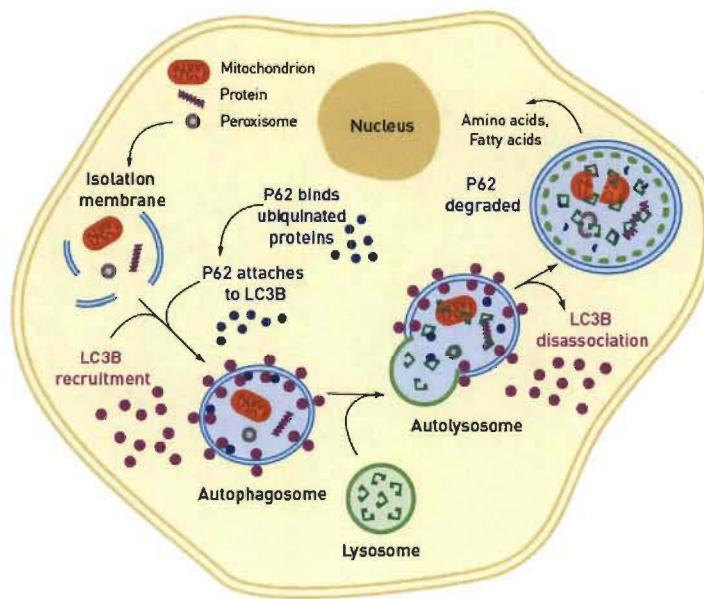
post-transcriptionnelle, LC3-II semble être impliqué dans l'elongation et la formation de l'autophagosome mature (Puyal 2009). La détection de LC3 par immunofluorescence ou Western Blot est considérée comme une méthode fiable qui permet de suivre le processus de l'autophagie (Tanida 2008).

- La protéine histone déacétylase-6 (HDAC6) est unique parmi la famille HDAC à posséder une activité de liaison à l'ubiquitine (Figure 1.9), et est capable de s'associer avec les microtubules ainsi qu'avec le cytosquelette d'actine (Lee 2010). Elle détecte un excès de protéines mal repliées et ubiquitinées en se liant avec haute affinité à l'ubiquitine, elle facilite aussi le transport des protéines ubiquitinées le long des microtubules jusqu'au autophagosome. HDAC6 régule aussi la maturation des vacuoles autophagiques en déacétylant la cortactin qui elle initie la polymérisation de la F-Actin, ce qui permet la fusion de l'autophagosome et le lysosome (Matthias 2012).



**Figure 1.9** Schéma représentant la fonction de HDAC dans le processus de l'autophagie; son association avec l'ubiquitine, son interaction avec le cytosquelette et sa régulation de la maturation des autophagosomes, ainsi que le rôle de LC3 dans la formation des phagophores. (Tirée de Matthias, O. T. a. P. « Interplay between histone deacetylases and autophagy - from cancer therapy to neurodegeneration ». Immunology and Cell Biology 90 (2012): 78-84).

- La protéine p62, aussi appelée séquestosome 1 (SQSTM1), interagit avec des agrégats de protéines poly-ubiquitinée par un domaine de liaison à l'ubiquitine, et avec LC3 par son domaine de liaison à LC3 (Figure 1.10), ciblant ainsi ces agrégats pour la dégradation dans les autolysosomes (Barth 2010). La protéine elle-même est dégradée par autophagie, et comme elle s'accumule lorsque l'autophagie est inhibée, et qu'une diminution des niveaux peut être observée lorsque l'autophagie est induite, p62 peut être utilisé comme marqueur pour étudier le flux autophagique (Bjorkoy 2009).



**Figure 1.10** Représentation schématique du rôle de p62 dans la voie de l'autophagie indiquant la relation entre LC3 et p62 et la dégradation de cette dernière par les autophagolysosomes. (Tirée de <http://www.lifetechnologies.com>)

### 1.2.3 La microautophagie

Durant ce mécanisme, les lysosomes engloutissent directement le cytoplasme contournant la nécessité de la formation des autophagosomes et des autophagolysosomes. En effet, ce processus implique directement la pinocytose de petites quantités du cytosol par les lysosomes. La microautophagie est active dans l'état de repos, et est responsable du renouvellement continu des constituants intracellulaires.

#### 1.2.4 L'autophagie médiée par les chaperons (CMA)

La CMA est responsable de la dégradation sélective de 30 % des protéines cytosoliques solubles ayant un pentapeptide unique (KFERQ). Cette séquence d'acides aminés est spécifiquement reconnue par une chaperone cytosolique, heat shock et ses co-chaperones qui vont diriger les protéines à dégrader dans les compartiments lysosomaux. Sur la paroi du lysosome, le complexe protéine-chaperone se lie à une protéine membranaire (LAMP2A), où la protéine à dégrader est dépliée et transloquée à travers la membrane lysosomale afin d'être dégradée. Ce processus est actif sous des conditions basales, mais un stress ainsi qu'une période prolongée de privation de nutriments peuvent aussi l'activer.

#### 1.2.5 Le rôle de l'autophagie dans la MP

La première évidence qui supporte le rôle significatif de l'autophagie dans la MP vient du fait que l'alpha-synucléine qui est un constituant majeur des corps de Lewy est dégradé par macroautophagie et CMA (Webb 2003, Vogiatzi 2008). Il a été révélé que dans les neurones sains, la clairance de l'alpha-synucléine par la CMA est cruciale pour limiter l'oligomérisation de l'alpha-synucléine. Cependant, les mutants A53T A30P de l'alpha-synucléine, qui causent la forme familiale de la MP, ont été trouvés à inhiber la CMA en présentant une affinité plus élevée pour LAMP2A (Cuervo 2004). Donc, les formes mutantes de l'alpha-synucléine sont mal intériorisées dans les lysosomes, et sont dégradées par macroautophagie au lieu de la CMA.

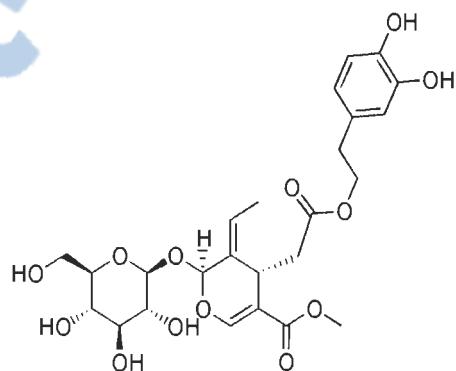
En plus de la dégradation de l'alpha-synucléine, la voie de l'autophagie est également impliquée dans le renouvellement des mitochondries. Le dysfonctionnement mitochondrial présente l'un des mécanismes pathologiques cruciaux dans la MP (Levy 2009). Cette idée a été plus élaborée dans la sous-sous-section 1.1.4.2 de ce mémoire.

## 1.3 L'oleeuropéine

### 1.3.1 Introduction

Des études épidémiologiques ont démontré que l'incidence des maladies cardiovasculaires et neurodégénératives était moindre dans les pays de la région méditerranéenne, c'est ce qui a alimenté une multitude de recherches sur le régime alimentaire de cette région. L'olive provenant de la plante *Olea europaea* est native de la région méditerranéenne, l'huile ainsi que le fruit sont des composants importants de la diète de cette région. Leurs propriétés pharmacologiques ont été reconnues comme composants importants en médecine et diète santé à cause de leurs composants phénoliques, dont l'Oe.

L'Oe fait partie de la famille des sécoiridoides (Figure 1.11), c'est le composant phénolique le plus important dans les cultivars d'olive et atteint des concentrations de plus de 140 mg/g sur base de matière sèche dans l'olive jeune, et 60 à 90 mg/g dans les feuilles (Syed Haris 2010).



**Figure 1.11** Structure chimique de l'Oleeuropéine. (Tirée de <http://en.wikipedia.org/wiki/Oleuropein>)

### 1.3.2 Biodisponibilité

L'Oe est très abondante dans la phase de croissance du fruit. Dans les jeunes fruits, elle peut atteindre 14 % de poids sec. Son niveau reste très important à la récolte de

cultivars verts. Cependant, dans les cultivars noirs, son niveau diminue très rapidement durant la maturation, dans quelques variétés, cela peut atteindre 0 quand le fruit est complètement noir.

Les composants phénoliques de l'huile d'olive vierge sont très bio-disponibles. En effet, des études ont démontré que l'absorption de l'Oe était de 55 à 60 % chez des sujets humains (Vissers 2002). Deux autres études ont démontré que l'Oe est rapidement absorbé après une administration orale avec une concentration plasmatique maximale survenant 2 heures après l'administration (Del Boccio 2003, Tan 2003).

Enfin, d'autres des recherches ont aussi démontré que l'Oe pouvait traverser la barrière hémato encéphalique (Serra 2012).

### 1.3.3 Effets pharmacologiques

L'Oe possède de nombreux effets pharmacologiques bénéfiques sur la santé tels qu'antioxydant et anti-inflammatoire comme l'ont démontré des études qui ont été réalisées sur des modèles *in vitro* et *in vivo*. De plus, plusieurs études épidémiologiques ont démontré que l'incidence de certains types de cancer dans le bassin méditerranéen est plus faible par rapport à d'autres régions (Barbaro 2014, Bulotta 2014).

Une étude *in vivo* montre que l'administration d'huile avec des concentrations croissantes d'Oe réduit l'excrétion urinaire de 8-iso-PGF2a, et ceci de manière dose-dépendante. Le 8-iso-PGF2a est un marqueur de la peroxydation des lipides, ce qui est une conséquence du stress oxydatif (Visioli 1998). Une autre étude *in vivo* indique que l'ajout de l'Oe augmente la capacité des LDL à résister à l'oxydation et en même temps réduit les taux plasmatiques de cholestérol total, libre et estérifié (Coni 2000).

De plus, l'Oe a démontré *in vitro* (Speroni E 1998) sa capacité à neutraliser les ERO (Visioli 1998) et à augmenter l'activité des molécules anti-oxydantes SOD (Andreadou 2006).

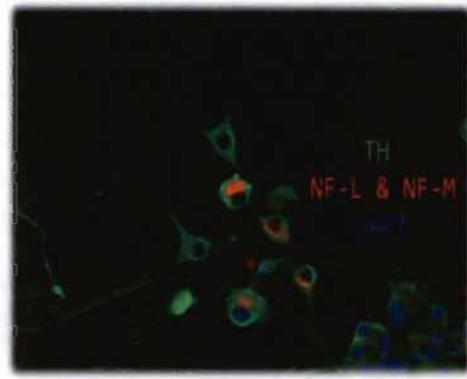
En ce qui concerne l'effet anti-inflammatoire, l'Oe agit en réduisant l'activité lypoxygenase et la production de leucotriène B4 (De la Puerta 1999). Quant à l'effet anti-cancer, l'Oe a démontré sa capacité à réduire la viabilité des cellules cancéreuses en inhibant leur taux de prolifération et en induisant l'apoptose (Han 2009).

Quant à l'effet neuroprotecteur, une étude a démontré que l'Oe peut diminuer et même prévenir l'agrégation du peptide  $\beta$ -amyloïde, l'un des principaux facteurs responsables de la neurodégénérescence dans la maladie d'Alzheimer (Bazoti 2006). De plus, l'Oe est un inhibiteur de Tau, une protéine associée aux microtubules connue pour former des dépôts d'amyloïdes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (Daccache 2011). En concordance avec les résultats qu'on a obtenus sur l'effet de l'Oe sur l'apoptose, Asban-Aliabadi *et al.* ont démontré que l'Oe exerce des effets anti-apoptotiques sur les cellules PC12 exposées à la 6-OHDA (Pasban-Aliabadi 2013). À notre connaissance, aucune étude n'a mis en évidence le rôle de l'Oe sur le mécanisme de l'autophagie. Le sujet de ce mémoire et de l'article est original et est d'actualité.

## 1.4 Modèles expérimentaux

### 1.4.1 Cellules PC12

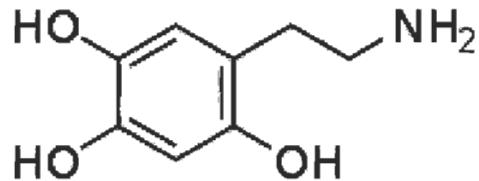
Les cellules PC12 proviennent d'un phéochromocytome de la glande surrénale du rat, d'où leur capacité à synthétiser des catécholamines, dont la dopamine. Après avoir été traitées avec un facteur de croissance qui est le Growth Nerve Factor (NGF), ces cellules arrêtent de proliférer et acquièrent des propriétés de neurones dopaminergiques (Figure 1.12). Les PC12 traitées avec la neurotoxine 6-OHDA sont utilisées comme modèle cellulaire de la MP. Les PC12 sécrètent exclusivement de la Dopamine lorsque différencier, expriment le DAT ainsi que les récepteurs pour l'estrogène alpha et bêta, les neurofilaments H-M et L. Donc, les travaux expérimentaux qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisés avec des cellules PC12 différencier en cellules neuronales.



**Figure 1.12** PC12 différencierées. (Tirée de Arel-Dubeau *et al.* Ox. Med Cell. Longevity, ID 425496, 2014).

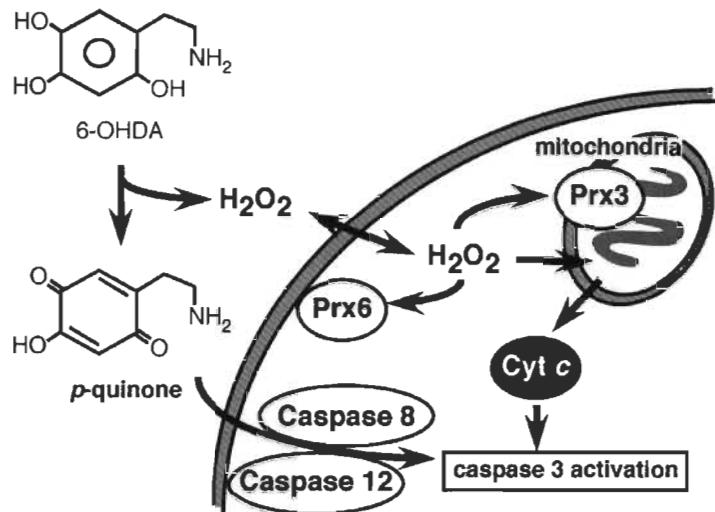
#### 1.4.2 Hydroxydopamine (6-OHDA)

La 6-OHDA (Figure 1.13) est la première neurotoxine catécholaminergique qui a été découverte et employée pour mimer la MP dans les modèles animaux et cellulaires puisqu'elle induit préférentiellement la mort des neurones dopaminergiques et noradrénergiques (Yelena 1995).



**Figure 1.13** Structure chimique de la 6-OHDA. (Tirée de <http://en.wikipedia.org/wiki/Oxidopamine>)

Il a été rapporté que la 6- OHDA est oxydé au niveau extracellulaire, sa toxicité est donc médiée par les produits d'oxydation générés, en particulier le peroxyde d'hydrogène et le p-quinone. Ce stress oxydatif induit un dysfonctionnement mitochondrial. En effet, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induit l'oxydation de la peroredoxine 3, la relâche du cytochrome c et par la suite l'activation de la caspase 3. Le quinone peut activer la caspase 3 en passant par les caspases 8 et 12 indépendamment de la mitochondrie. Ce qui conduit à l'apoptose des cellules catécholaminergiques (Figure 1.14) (Hanrott 2006, Saito 2007).



**Figure 1.14** Mécanismes d'action proposés pour la mort cellulaire des PC12 induite par la 6-OHDA. (Tirée de Saito, Y. et al. « Molecular mechanisms of 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity in PC12 cells: involvement of hydrogen peroxide-dependent and -independent action ». Free Radic Biol Med 42(5) (2007): 675-685.

## 1.5 Objectifs

Étant donné les nombreuses vertus qu'offre l'Oe, nous avons estimé important d'évaluer son potentiel neuroprotecteur *in vitro* sur des neurones dopaminergiques en culture, les cellules PC12 différencierées. Des résultats du laboratoire précédents à mon mémoire ont montré que l'Oe à une concentration de 10<sup>-12</sup> M induit une diminution significative de l'apoptose dans les cellules PC12 différencierées traitées avec la 6-OHDA. Je me suis donc intéressée au mécanisme d'action de l'Oe. L'objectif principal de mon mémoire était d'élucider le processus par lequel cette molécule exerçait son effet neuroprotecteur. Pour cela, mon mémoire s'est appuyé sur deux volets :

- J'ai en premier lieu vérifié les propriétés antioxydantes de l'Oe par test de MitoSox.
- En deuxième lieu, j'ai analysé l'effet de l'Oe sur la voie de l'autophagie, ce qui nous a amenés à étudier ce processus c'est l'hypothèse que l'Oe pourrait avoir un effet sur la MP en agissant sur l'autophagie, ce mécanisme qui est devenu au cours des dernières années le centre d'attention de plusieurs chercheurs et

qui surtout a démontré une relation étroite avec la pathogénèse de la MP. À cette fin, des marqueurs fiables de l'autophagie tels que LC3, HDAC6, et l'expression de P62 par immunofluorescence et Western Blot ont été mesuré. De plus, afin de voir l'effet de l'Oe sur les lysosomes et mitochondries, on a utilisé respectivement les marqueurs suivants LAMP2 et mtHSP70.

Mes résultats, résumés dans l'article scientifique, ont démontré que des faibles doses d'Oe,  $10^{-12}$  M, exercent un effet anti-oxydant et neuroprotecteur sur les PC12 neuronales. De plus, ces faibles doses d'Oe peuvent moduler le processus d'autophagie. Il est encore trop tôt pour déterminer si l'Oe peut être considérée autant que molécule pro-ou anti-autophagique.

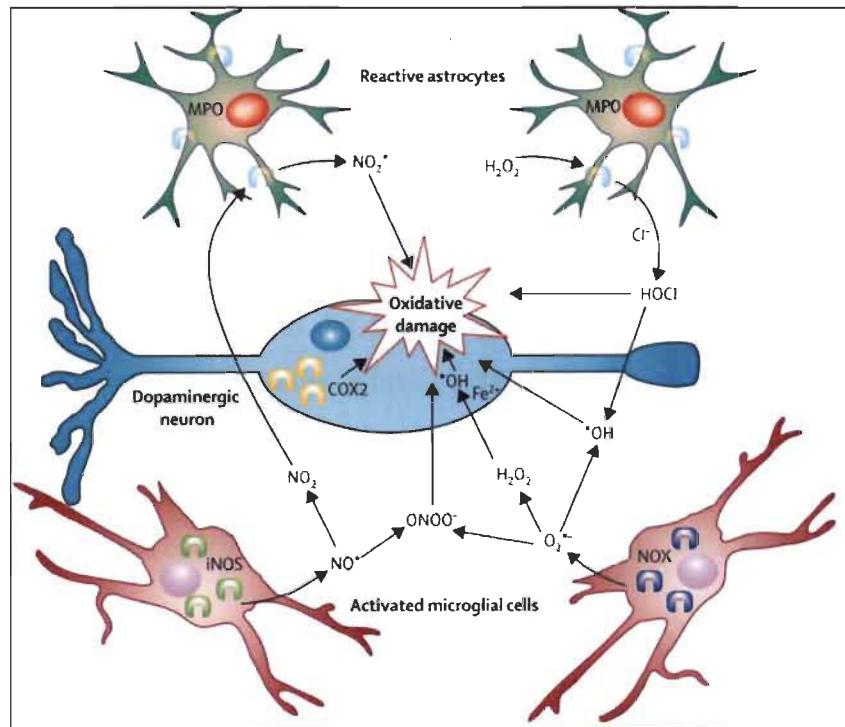
## CHAPITRE II

### LES PROPRIÉTÉS NEUOPROTECTRICES ET AUTOPHAGIQUES DE L'OLEUROPÉINE SUR DES NEURONES DOPAMINERGIQUES SOUMIS À UN STRESS OXYDATIF

#### 2.1 Contribution des auteurs

15

astroglose, et une infiltration lymphocytaire. À la suite d'une activation appropriée, les cellules microgliales peuvent exercer une activité antimicrobienne, et induire une toxicité cellulaire par la production et la libération des ERO et de l'azote. Bien que peu réactifs, les radicaux libres NO et O<sub>2</sub><sup>-</sup> peuvent se combiner pour former des espèces hautement réactives d'azote peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) (Figure 1.7). Ces dernières peuvent causer des dommages oxydatifs dans diverses protéines, telles que la tyrosine hydroxylase et l' $\alpha$ -synucléine, et ainsi contribuer à la dégénérescence des neurones dopaminergiques (Hirsch 2009).



cytotoxicité ainsi qu'un test de fragmentation de l'ADN. Ces derniers ont démontré que notre molécule naturelle agit autant que neuroprotecteur sur les neurones dopaminergiques en réduisant le taux de mort cellulaire induite par la 6-OHDA. Dans le but d'évaluer l'effet antioxydant de l'Oe, le test de MitoSox a été utilisé. Les résultats indiquent que l'Oe protège les cellules PC12 différencierées en neurones dopaminergiques contre l'oxydation induite par le diéthyldithiocarbamate (DDC) qui est considéré comme un pro-oxydant, inhibiteur de la SOD. Enfin, afin de connaître l'effet de l'Oe sur le processus qui joue un rôle critique dans la pathogénèse de la maladie de Parkinson et qui est l'autophagie, on a mesuré des marqueurs importants de l'autophagie comme LC3 et p62 par immunofluorescence et immunobuvardage de type Western. En conclusion, l'Oe possède des propriétés neuroprotectrices qui pourraient être reliées à son effet antioxydant ainsi qu'à sa capacité à moduler le mécanisme de l'autophagie.

## 2.3 Article scientifique

### **Neuroprotective properties of oleuropein against 6-hydroxydopamine in neuronal PC12 cells**

Imène Achour<sup>1</sup>, Anne-Marie Arel-Dubeau<sup>1</sup>, Manon Legrand<sup>1</sup>, Everaldo Attard<sup>2</sup>,  
Marc Germain<sup>1</sup> and M-G. Martinoli<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup> Institute of Earth Systems, University of Malta, Msida, Malta

\* Corresponding author:

Maria-Grazia Martinoli, Ph.D

Dept. of Medical Biology

Université du Québec à Trois-Rivières

3351 boul. des Forges, Trois-Rivières

G9A 5H7, Qc, Canada

E-mail: [maria-grazia.martinoli@uqtr.ca](mailto:maria-grazia.martinoli@uqtr.ca)

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

## Abstract

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder, primarily affecting dopaminergic neurons in the substantia nigra. Currently, there is no cure for PD and present medications are aimed at reducing clinical symptoms. The goal of this study was to investigate whether Oleuropein (Ole), a phenolic compound found in olive leaf, may protect neuronal cells against degeneration in a cellular model of PD, neuronal PC12 cells, exposed to the potent neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Cytotoxicity assays showed that the administration of Ole prior to the oxidative insult prevents cell death induced by 6-OHDA. Furthermore, the results obtained by measuring specific apoptotic DNA fragmentation, demonstrate that Ole significantly decreases apoptosis. The antioxydative effect of Ole was evaluated by MitoSOX red, and data showed that Ole reduces the production of reactive oxygen species induced by *N,N*-diethyldithiocarbamate (DDC). A growing body of evidence shows that autophagy plays a key role in the pathogenesis of PD. Indeed, we observed autophagic vacuoles in the cytoplasm of neuronal cells treated with Ole. We identified them by labeling with Cyto-ID and by measuring additional markers of autophagy-related processes such as LC3, HDAC6, LAMP2, mtHSP70, and p-62 expression by immunofluorescence and Western blots. Altogether, the results obtained suggest that Ole exerts neuroprotective properties against 6-OHDA-induced neurotoxicity related to its antioxydative effect and its ability to modulate the mechanism of autophagy.

## Introduction

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder, characterized by a loss of nigrostriatal dopaminergic neurons and the presence of intraneuronal proteinaceous cytoplasmic inclusions, termed "Lewy Body" (LB)<sup>1</sup>. Currently, an increasing body of evidence supports also the emerging role of autophagy in the pathogenesis of PD<sup>2,3</sup>. Autophagy is a lysosome-mediated degradation process for non-essential or damaged cellular constituents. Indeed, cytoplasmic constituents, damaged organelles, as well as intracellular pathogens are sequestered into double membrane autophagosomes and their contents degraded by lysosomal hydrolases<sup>4</sup>. The degradation of target substrates is mediated by three distinct processes: macroautophagy, microautophagy and chaperone-mediated autophagy (CMA). Banerjee *et al.*<sup>4</sup> found that dysregulation of autophagy results in accumulation of abnormal proteins, as observed in PD. Moreover, Vogiatz, T *et al.*<sup>5</sup> demonstrated that CMA and macroautophagy can degrade  $\alpha$ -synuclein, the main component of LB.

Current treatments for PD aim to target symptoms and slow disease progression<sup>6</sup>. Recent literature pinpoint novel strategies to prevent or reduce neuronal death as such limit neurodegeneration<sup>7,8</sup>. Following this line of evidences, several phenolic compounds such as caffeic acid and tyrosol proved their neuroprotective properties in the context of PD<sup>9</sup>.

Oleuropein (Ole) is a phenolic compound found in the olive leaf from *Olea europaea*, it is believed to have various pharmacological benefits, including antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic properties<sup>10</sup>. Ole demonstrated its ability to neutralize ROS<sup>11</sup> *in vitro* and enhances the activity of antioxidant enzymes, superoxide dismutases (SOD)<sup>12</sup>. Vissers *et al.*<sup>13</sup> showed that absorption of administrated oleuropein was 55-60% in human subjects. Another study found that Ole can cross the blood-brain barrier<sup>4</sup>. It has been reported that 6-OHDA is extracellularly oxidized, and the oxidative products generated mediates its toxicity, in particular hydrogen peroxide. Moreover, oxidative stress induces mitochondrial dysfunction, consequent release of cytochrome c, and activation of caspase 3/7, which leads to apoptosis of catecholaminergic cells<sup>15</sup>.

In the present study, we evaluated the neuroprotective and antioxydative effects of Ole in a known cellular model of PD, neuronal PC12 cells exposed to the potent neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA)<sup>16, 17, 18, 19, 20</sup>. Furthermore, we compared the presence of autophagic vacuoles following the administration of Ole and 6-OHDA.

Our results illustrate that the administration of Ole prevent in part neuronal damages provoked by 6-OHDA. Moreover, Ole significantly decreases ssDNA fragmentation and reduces inducible •O<sub>2</sub>– production. Finally, these data demonstrates that Ole can act on the induction and degradation related to autophagy.

## **Materials and methods**

### Drugs and chemicals

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

### Cell culture and treatments

Rat PC12 cells were obtained from ATCC (Rockville, MD) and were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated horse serum (HS) and 5% heat inactivated fetal bovine serum (FBS; Corning Cellgro, Manassas, VA). PC12 cells were fed with fresh medium every 2 days and maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Neuronal differentiation was induced using nerve growth factor-7S (NGF, 75 ng/mL) in RPMI 1640 supplemented with 1% FBS for 7 days, as already described<sup>21, 17</sup>. For the different experiments, differentiated PC12 cells were pretreated with 10<sup>-12</sup> M Ole for 3 h, then 6-OHDA 20 µM was added to the medium for 24 h. All of these experimental conditions were selected after time course and dose response studies (data not shown). For cytotoxicity and DNA fragmentation assays we used 40 µM of 6-OHDA. Bafilomycin A<sub>1</sub> (Baf) 100 nM was used as positive autophagy control. Baf inhibits lysosomal autophagosome degradation and provokes the accumulation of autophagic vacuoles in the cytoplasm<sup>22, 23</sup>. It was used on live cells

1 hour prior to extraction or fixation. All experiments were performed in charcoal-stripped serum to remove steroids from the medium.

### Cytotoxicity Measurements

Cytotoxicity was evaluated by colorimetric assay based on the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity released from damaged cells into the supernatant, as already described<sup>16</sup>. LDH, a stable cytoplasmic enzyme present in all cells, is rapidly released into the cell culture supernatant upon plasma membrane damage. Enzyme activity in the culture supernatant correlates with the proportion of lysed cells<sup>24, 25</sup>. Briefly, 100 µL of cell-free supernatant served to quantify LDH activity by measuring absorbance at 490 nm in a microplate reader (Thermo Lab Systems, Franklin, MA). Total cellular LDH was determined by lysing the cells with 1% Triton X-100 (high control); the assay medium was used as a low control and was subtracted from all absorbance measurements:

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{Experimental value} - \text{Low control}}{\text{High control} - \text{Low control}} \times 100$$

### DNA Fragmentation Analysis

DNA fragmentation was assessed with the single-stranded DNA (ssDNA) apoptosis ELISA kit (Millipore, CA) as already described<sup>17</sup>. This procedure is based on selective DNA denaturation by formamide in apoptotic cells but not in necrotic cells or in cells with DNA damage in the absence of apoptosis. 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 apoptosis. Importantly, this technique specifically enables the identification of apoptotic DNA even in the early stages of apoptosis because the monoclonal antibody to ssDNA requires a long stretch of ssDNA, thus it does not react with ssDNA ends present in necrotic cells<sup>26</sup>. The detection of denatured DNA was performed with a monoclonal antibody to ssDNA. The staining of ssDNA in early apoptosis was undertaken with a mixture of antibody and peroxidase-

labelled secondary antibody. The reaction was then stopped, and ssDNA fragmentation was quantified by measuring absorbance at 405nm in a microplate reader (Thermo Lab Systems). ssDNA was calculated 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<sup>27, 28</sup>.

#### Detection of Mitochondrial •O<sub>2</sub>–

MitoSOX Red (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) was used to estimate intracellular •O<sub>2</sub>– production as already described<sup>28</sup>. This fluorogenic dye is a highly selective indicator of •O<sub>2</sub>– in the mitochondria of living cells. Once in the mitochondria, it is oxidized by superoxide and exhibits red fluorescence. Neuronal PC12 cells were grown and treated on collagen-coated circular glass coverslips. After treatment, the medium was removed and the cells were incubated with MitoSOX Red (5 mM) for 10 min at 37°C. Neuronal cells were washed with Hanks' buffered salt solution and all nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2- phenylindole (DAPI). Then, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min at 37°C. Coverslips were mounted with Molecular Probes ProLong Antifade kit (Invitrogen). Sodium diethyldithiocarbamate (DDC) is an inhibitor of superoxide dismutase and it was used as positive control. Fluorescence intensity was measured using NIS Elements 2.2 software (Nikon).

#### Detection of autophagic vacuoles by Cyto-ID

The Cyto-ID Autophagy Detection Kit (Enzo Life Sciences) was used to visualize autophagic vacuoles<sup>29, 30</sup>. The cationic fluorophore stains pre-autophagosomes, autophagosomes and autophagolysosomes<sup>31</sup>. Neuronal PC12 cells were pretreated with 10<sup>-12</sup> M Ole for 3 h, then 6-OHDA 20 µM was added to the medium for 24 h. According to manufacturer's instructions, the medium was removed and the cells were incubated with Cyto-ID (1:500) for 30 min at 37°C and washed with phosphate buffered saline (PBS). Hoescht 33342 (5 µg/ml) was used to counterstain all nuclei. Then, the cells were

fixed in 4% PFA for 15 min at 37°C and coverslips were mounted with Molecular Probes ProLong Antifade kit (Invitrogen). Images were acquired with an Orthoplan fluorescence microscope (Leica) with necessary filter cubes.

### Fluorescence Microscopy

#### *Anti-LC3 and anti-HDAC*

We used collagen-coated coverslips in 24-well plates for the differentiation and treatment of PC12 cells. After treatment with Ole and 6-OHDA, PC12 cells were fixed in 4% PFA for 15min at 37°C. The PFA was removed and the cells were permeabilized with the Fish Skin Gelatin Buffer + Triton (TBS, 1% BSA, 0.18% fish skin gelatin, 0.1% Triton-X, 0.02% sodium azide) for 30 min at 37°C. In order to monitor autophagy-related processes, cells were exposed to a primary antibody for microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (anti-LC3, Cell Signaling), and anti-HDAC6 (Novus Biologicals) 1:500 overnight at 4°C. Then, cells were washed with PBS and incubated with corresponding secondary antibodies (Cy3 for LC3 and Alexa fluor 488 for HDAC6). DAPI counterstained all nuclei. Coverslips were mounted with Molecular Probes ProLong Antifade kit (Invitrogen). Images were examined under an Olympus Corp. FV1200S confocal microscope using Fluoview10-ASW 4.0 software (Olympus, Richmond Hill, On. Canada).

#### *Anti-Lamp2 and anti-mtHSP70*

After treatment with Ole and 6-OHDA, PC12 cells were fixed with 4% PFA for 15 min at 37°C. The PFA was removed and the cells were permeabilized with PBS + 0.2% Triton X-100 for 2 min at 37°C. Then, fixed cells were blocked with PBS + 0.1% Triton + 1% BSA for 10 min. Cells were incubated with lysosome-associated membrane protein 2-a (anti-LAMP2, Novus Biologicals), 1:100, and with mitochondria-specific heat shock protein-70 (anti-mtHSP70, ABR Bioreagents), 1:200, for 1 h at 37°C. Then, slides were washed with PBS. Finally, PC12 cells were stained with alexafluor 488 and 594 secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch). DAPI

counterstained all nuclei. Coverslips were mounted with Mount Immu-mount (Thermo lab System). Images were acquired with a confocal microscope using ZEN Imaging software (Zeiss, Toronto, On, Canada).

#### Electrophoresis and Immunoblot Analysis

NGF-differentiated PC12 cells were grown and treated in collagen-coated 6-well plates. Total proteins were extracted with a Nuclear Extraction Kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA). The protein concentration was determined by using the BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA). Equal amounts of protein were loaded onto a 12% SDS-polyacrylamide gel. After electrophoretic separation, the polyacrylamide gels were transferred onto PVDF membranes (0.22 µm pore size, BioRad, Mississauga, On, Canada). The membranes were blocked for 30min at room temperature in Blotto B mixture (1% BSA, 1% non-fat powder milk, 0.05% Tween-20 in TBS buffer solution), then incubated with Primary anti-LC3 (1:500, Cell Signaling Canada), anti-p62 (1:500, Progen Biotechnik GmbH, GP62-C), and anti-actin. Blots were washed and then incubated with PODconjugated secondary antibody (1:2000) for 1 h at room temperature and finally developed with an enhanced chemiluminescence substrate solution (Thermo Scientific). Immunopositive signals were visualized by the AlphaEase FC imaging system (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA) and analyzed with analyzed with AlphaEase FC software (Alpha Innotech) and ImageJ (imagej.nih.gov).

#### Statistical analysis

Significant differences between treatment effects were determined by 1-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls analysis with the GraphPad Instat program, version 3.06, for Windows© (San Diego, CA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) All data, analyzed at the 95% confidence interval, were expressed as means ± SEM from at least 3 independent experiments. Asterisks indicate statistical differences between 6-OHDA or Baf or DDC and control (\*\* P < 0.001, \*\* P < 0.01, \* P < 0.05) and plus signs (+)

denote statistical differences between the treatment and 6-OHDA or Baf or DDC condition (<sup>+++</sup> P < 0.001, <sup>++</sup> P < 0.01, <sup>+</sup> P < 0.05).

## Results

### Oleuropein reduces 6-OHDA induced cellular death and oxidative stress

Figure 1A shows significant neuronal cell death after 24 h exposure to 40 µM of 6-OHDA compared to the control condition. A 3 h pre-treatment with 10<sup>-12</sup> M Ole reduced significantly the toxic effect of 6-OHDA in neuronal PC12 cells (Ole + 6-OHDA).

Figure 1B illustrates that the administration of 6-OHDA alone for 24 h significantly increased ssDNA fragmentation of 45% compared to the control condition. Our results show that the pre-treatment of neuronal PC12 cells with Ole prior to 6-OHDA considerably attenuated the amount of ssDNA fragmentation (Ole + 6-OHDA).

To investigate the mechanism underlying the protective properties of Ole against 6-OHDA treatment in neuronal PC12 cells, we estimated •O<sub>2</sub><sup>-</sup> production with MitoSOX Red. Figure 2A and 2B show the highest level of fluorescence after administration of DDC, an inhibitor of Superoxide dismutase, while the pre-treatment with Ole strongly mitigated the DDC-induced production of •O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

### Oleuropein modulates the autophagic flux

To compare the presence of autophagic vacuoles in neuronal PC12 cells under 6-OHDA and Ole administration, we used Cyto-ID. The Cyto-ID kit is a cationic fluophore that stains autophagic vacuoles<sup>29, 30</sup>. In Fig. 3, we observed that an increased fluorescent signal in neuronal PC12 cells pre-treated with Ole alone (Ole) compared to

control and 6-OHDA conditions, which might be a result of an enhanced activation of autophagy, or the consequence of a defect in autophagosomal maturation.

To further study the autophagic activity of Ole, we then used reliable immunological markers of autophagy such as LC3, HDAC6, and P62.

LC3 is a protein found in the membrane of autophagic vacuoles. The detection of processed LC3B-II by Western blot or fluorescence studies, is paramount for autophagy detection<sup>32</sup>. HDAC6 is a histone deacetylase that controls the fusion of autophagosomes to lysosomes, which is an important step of the autophagic degradation<sup>33</sup>. Finally the p62 protein serves as a link between LC3 and ubiquitinated substrates. p62 becomes incorporated into the completed autophagosome and is degraded in autolysosomes<sup>34</sup>. Figure 4 of the present article illustrates immunofluorescence using the antibodies against LC3 and HDAC6. Optical observation show that Bafilomycin (Baf), used as a positive control because of its ability to inhibit the autophagosome-lysosome's fusion<sup>22</sup>, can indeed increase red (LC3) and green (HDAC6) fluorescence in Ole and Ole + Baf conditions, we did not notice a difference in the amount of fluorescence of LC3 and HDAC6 compared to the control. These qualitative results were confirmed by Western Blot analysis using anti-LC3 (fig. 5A). Indeed, we observed that Ole did not increase LC3 expression compared to the control. Moreover, when Baf was added together with Ole the amount of LC3 stays stable, thus supporting optical observation shown in Fig. 4.

Since, changes in p62 protein levels are used to monitor selective autophagy<sup>32</sup>, figure 5B shows that p62 expression as detected by immunoblotting correlated with LC3 results.

Oleuropein reverts abnormal relocalization of lysosomes and mitochondria induced by 6-OHDA

To visualize lysosomes and mitochondria, we used fluorescent antibodies against LAMP2 and mitochondrial HSP70, respectively (Fig. 6). In control and Ole conditions (first and second columns), lysosomes (green) and mitochondria (red) were dispersed

through the cytoplasm. In 6-OHDA condition (third column), immunofluorescence shows that lysosomes were located near the nucleus, while mitochondria were around the lysosomes. The pre-treatment of neuronal PC12 cells with Ole partly reverts the abnormal localization of lysosomes and mitochondria, induced by 6-OHDA as shown in figure 6, fourth column.

## Discussion

A growing body of literature is reporting the role of polyphenols for the prevention of cancer, cardiovascular disease and neurodegeneration<sup>9, 35, 36</sup>. Ole is the major phenolic compound in olive oil, already known to possess various pharmacological benefits<sup>10</sup>. For example, Ole consumption has been correlated to reduction of coronary heart disease, certain cancers including colon, breast and skin cancer<sup>37</sup>, and to the prevention of Aβ aggregation, characteristic to Alzheimer's disease<sup>38</sup>.

The aim of this study was to evaluate the neuroprotective effect of Ole in a cellular model of PD, neuronal PC12 cells exposed to the neurotoxin 6-OHDA<sup>16, 17, 18, 19, 20</sup>. Our data showed that Ole can reduce the cell death when administrated prior to 6-OHDA, as demonstrated by the cytotoxicity and ssDNA fragmentation assays. Altogether these data confirm that Ole has neuroprotective properties in a dopaminergic cellular model. We also wanted to elucidate the underlying mechanism of neuroprotection mediated by Ole. Since oxidative stress has been reported to play a role as a mediator of nerve cell death<sup>1</sup> and recent other literature reported the anti-oxidative effect of Ole as well as its ability to decrease the intracellular levels of ROS<sup>10</sup>, we estimated •O<sub>2</sub>– production with MitoSOX Red. We found a significant reduction of •O<sub>2</sub>– production when neuronal cells were pre-treated with Ole prior to treatment with DDC, a potent SOD inhibitor.

The link between autophagy and neurodegenerative diseases has been recently established<sup>4</sup>. Autophagy is a lysosome-mediated process which ensures the degradation of damaged cellular constituents and misfolded proteins<sup>39</sup>. It is considered as the

mediator between neuronal survival and death in neurodegenerative diseases<sup>4</sup>. Therapeutic interventions that activate autophagy might be beneficial in the prevention of neuronal cell death<sup>4</sup> in neurodegenerative diseases characterized by autophagic pathway(s) dysregulation like PD. Thus, we investigate whether Ole exerts its neuroprotective potential by acting on autophagy, by staining specific autophagy markers to monitor the autophagic flux.

As shown by Cyto-ID, the fluorescence correlated with the presence of autophagic vacuoles was increased after treatment with Ole compared to the control. However, increased autophagic vacuoles levels can be associated with either enhanced autophagosome synthesis or reduced autophagosome turnover, which might be due to delayed trafficking to the lysosomes, reduced fusion between compartments or impaired lysosomal proteolytic activity<sup>32</sup>. In order to further study the role of Ole in the process of autophagy, we measured the expression of specific markers of the autophagy process such as LC3 and p62<sup>34</sup> and the relation between lysosomes and mitochondria in the cells by targeting LAMP2<sup>40</sup> and mtHSP70<sup>41</sup>. HDAC6 regulates autophagic maturation by deacetylating cortactin, which in turns initiates F-actin polymerization. This is necessary for fusion of the autophagosome to lysosomes, the latter contains hydrolase that will degrade the aggregate<sup>33</sup>. Our results indicate that both anti-LC3 and anti-HDAC6 fluorescence is higher when the neuronal cells are treated with Baf, strongly suggesting that autophagic vacuoles are increased. When neuronal PC12 cells are treated with Ole alone we did not find increase in the amount of autophagic vacuoles compared to controls. These results were sustained by measuring the protein expression of LC3 and p62 by Western Blot. Furthermore, we noticed that Ole + Baf treatment couldn't reverse the effect of Baf on LC3 and p62 levels. These results suggest that Ole reduce the induction and the turnover of autophagosome. Furthermore, since Ole diminished p62 level, we can hypothesize that Ole can regulate the expression of the protein p62.

In order to visualize lysosomes and mitochondria, we used antibodies against LAMP2 and HSP70, respectively. Indeed, LAMP2 is a protein found in the membrane of lysosome<sup>40</sup>, while mtHSP70, it is a heat shock protein responsible of the import and

folding of mitochondrial proteins and is used as a marker of mitochondria<sup>41</sup>. As shown in figure 6, the abnormal localization of lysosomes and mitochondria induced by 6-OHDA is reversed when neuronal PC12 cells are treated with Ole, suggesting a novel role for Ole as a modulator of intracellular organelles localization.

In summary, our data demonstrated that Ole has neuroprotective and antioxydative properties in an *in vitro* model of PD. Ole also shows an interesting effect on autophagy, this neuroprotective molecule can modulate the mechanism of autophagy by acting on the its induction and degradation. Indeed, it must be noticed that autophagy require accurate titration to ensure that its activity is carefully controlled since downregulation or excessive autophagy could aggravate neurodegeneration<sup>4</sup>.

### Acknowledgments

This work was funded by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant to MGM.

### References

1. Dauer W, and Przedborski S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* 2003; Vol. 39, 889-909.
2. Lynch-Day MA, Mao K, Wang K, *et al*. The role of autophagy in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2(4): a009357.
3. Cheung ZH and Nancy Y Ip. The emerging role of autophagy in Parkinson's disease. *Mol Brain* 2009; 2: 29.
4. Banerjee R, Beal MF, Thomas B. Autophagy in neurodegenerative disorders: pathogenic roles and therapeutic implications. *Trends Neurosci* 2010; 33(12) :541-9.
5. Vogiatz T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis l. Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J Biol Chem* 2008; 283(35): 23542-56.

6. Stacey E. Seidi and Judith A Potashkin. The Promise of Neuroprotective Agents in Parkinson's Disease. *Front Neurol* 2011; 2: 68.
7. Ashraf Virmani & Luigi Pinto & Zbigniew Binienda & Syed Ali. Neuroprotection by what you eat. *Mol Neurobiol* 2013; 48: 353-362.
8. Bousquet M, Calon F, and Cicchetti F. Impact of omega-3 fatty acids in Parkinson's disease. *Ageing Res* 2011; Rev. 10, 453-463.
9. Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Giulia Corona *et al.* Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action. *Nutrients* 2010; 2, 1106-1131.
10. Syed Haris O. Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Sci Pharm* 2010; 78(2): 133-154.
11. Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil Polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247(1): 60-4.
12. Andreadou I, Iliodromitis EK *et al.* The olive constituent oleuropein exhibits antiischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *J Nutr* 2006; 136(8): 2213-9.
13. Vissers MN, Zock PL, Roodenburg AJ, Leenen R, Katan MB. Olive oil phenols are absorbed in humans. *J Nutr* 2002; 132(3): 409-17.
14. Serra A, Rubio' L, Borra's X *et al.* Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Mol. Nutr. Food Res* 2012; 56, 486-496.
15. Hanrott K, Gudmunsen L, J. O'Neill M and Susan Wonnacott. 6-Hydroxydopamine-induced Apoptosis is Mediated via Extracellular Auto-oxidation of Protein Kinase C  $\delta$  and Caspase 3-dependent Activation. *J. Biol. Chem* 2005; 281: 5373-5382.
16. Gélinas S, Martinoli MG. Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP<sup>+</sup>-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells. *J Neurosci Res* 2002; 70(1): 90-96.
17. Bournival J, Quessy P and Martinoli MG. Protective Effects of Resveratrol and Quercetin Against MPP<sup>+</sup>-Induced Oxidative Stress Act by Modulating Markers of Apoptotic Death in Dopaminergic Neurons. *Cell Mol Neurobiol* 2009; 29: 1169-1180.

18. Justine Renaud and Maria-Grazia Martinoli. Propriétés neuroprotectrices, antioxydantes et anti-inflammatoires du resvératrol dans les neurones dopaminergiques. MSA Médecine Science Amérique 2011; 1:1.
19. Renaud J, Bournival J, Zottig X and Maria-Grazia Martinoli. Resveratrol Protects DAergic PC12 Cells from High Glucose-Induced Oxidative Stress and Apoptosis: Effect on p53 and GRP75 Localization. Neurotoxicity Research 2014; 25:1, 110-123.
20. Arel-Dubeau, A. M, Longpre, F, Bournival, J *et al.* Cucurbitacin E has neuroprotective properties and autophagic modulating activities on dopaminergic neurons. Oxid Med Cell Longev 2014; 2014, Article ID 425496, 15 p.
21. Lahaie-Collins V, Bournival J, Plouffe M *et al.* Sesamin modulates tyrosine hydroxylase, superoxide dismutase, catalase, inducible NO synthase and interleukin-6 expression in dopaminergic cells under MPP<sup>+</sup>-induced oxidative stress. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2008; 1:1, 54-62.
22. 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.
23. 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.
24. Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. J Immunol Methods 1998; 115:61-69.
25. Martin A, Clynes M. Acid phosphatase: endpoint for in vitro toxicity tests. In Vitro Cell Dev Biol 1991; 27A: 183-184.
- 26 Frankfurt OS, Krishan A. Identification of apoptotic cells by formamide-induced DNA denaturation in condensed chromatin. J Histochem Cytochem 2001; 49(3): 369-78.
27. 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.

28. Bounival J, Plouffe M, Renaud J *et al.* Quercetin and sesamin protect dopamineergic cells from MPP+-induced neuroinflammation in a microglial (N9)-neuronal (PC12) coculture system. *Ox. Med. Cell. Long* 2012; Article ID 921941, 11 pages.
29. M. Balan, S. Pal. A Novel CXCR3-B Chemokine Receptor-induced Growth-inhibitory Signal in Cancer Cells Is Mediated through the Regulation of Bach-1 Protein and Nrf2 Protein Nuclear Translocation. *J. Biol. Chem* 2014; 289, 3126.
30. L.C. Koay, *et al.* Cannabinoid-induced autophagy regulates suppressor of cytokine signaling-3 in intestinal epithelium. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 2014; 307, G140.
31. Enzo Life Sciences: <http://www.enzolifesciences.com/ENZ-51031/cyto-id-autophagy-detection-kit/>
32. Barth S, Glick D, and Macleod KF. Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol* 2010; 221(2): 117-124.
33. Lee JY, Koga H, Kawaguchi Y *et al.* HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *The EMBO Journal* 2010; 29, 969-980.
34. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P *et al.* guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 2008; 4(2): 151-175.
35. Zern, T.L.; Wood, R.J.; Greene, C.; West, K.L.; Liu, Y.; Aggarwal, D.; Shachter, N.S.; Fernandez, M.L. Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. *J. Nutr.* 2005, 135, 1911-1917.
36. Fuhrman, B.; Volkova, N.; Coleman, R.; Aviram, M. Grape powder polyphenols attenuate atherosclerosis development in apolipoprotein E deficient (E0) mice and reduce macrophage atherogenicity. *J. Nutr.* 2005, 135, 722-728.
37. Barbaro B, Toietta G, Maggio R *et al.* Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *Int J Mol Sci* 2014; 15:10, 18508-24.
38. Bazoti FN, Bergquist J, Markides K, Tsarbopoulos A. Noncovalent Interaction between Amyloid- $\beta$ -Peptide (1-40) and Oleuropein Studied by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2006; 17: 568-575.

39. Noboru Mizushima. Autophagy: process and function. *Genes and Dev* 2007; 21: 2861-2873.
40. Saftig P, Beertsen W, and Eskelin EL. LAMP2, A control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy* 2008; 4:4, 510-512.
41. Schneider, H.C, Berthold J, Bauer MF *et al.* Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature* 1994; 371, 768-74.

### Legends to the figures

**Fig. 1 A.** Effect of Ole on 6-OHDA-induced toxicity, as revealed by measuring LDH activity in supernatants after 24 h of treatment. Neuronal cells were pre-treated with  $10^{-12}$  M Ole for 3 h, and then 40  $\mu$ M of 6-OHDA was added for 24 h. Pre-treatment with oleuropein clearly decreased neuronal PC12 cell death. n=6 \*\*\*P < 0.001 compared to control and  $^+P < 0.05$  compared to 6-OHDA. **B.** Histogram of ssDNA fragmentation in neuronal PC12 cells. Pre-treatment of PC12 cells with Ole  $10^{-12}$  M prior to 6-OHDA 40  $\mu$ M shows a significant decrease in DNA fragmentation. n=3 \*\*P < 0.01 compared to control and  $^{++}P < 0.01$  compared to 6-OHDA.

**Fig. 2.** Selective detection of superoxide anion by MitoSOX Red. Neuronal cells were pre-treated with  $10^{-12}$  M Ole for 3 h. DDC is an inhibitor of superoxide dismutase, and was used as a positive control. **A.** Fluorescence microscopy. A significant MitoSOX Red Signal is observed in DDC exposed cells. When added to DDC, Ole reduced red fluorescence. **B.** Histogram. Semi-quantitative measures of MitoSOX Red fluorescence. Ole reduced significantly the generation of intracellular ROS induced by DDC. n=3 \*P < 0.05 compared to Control and  $^+P < 0.05$  compared to DDC.

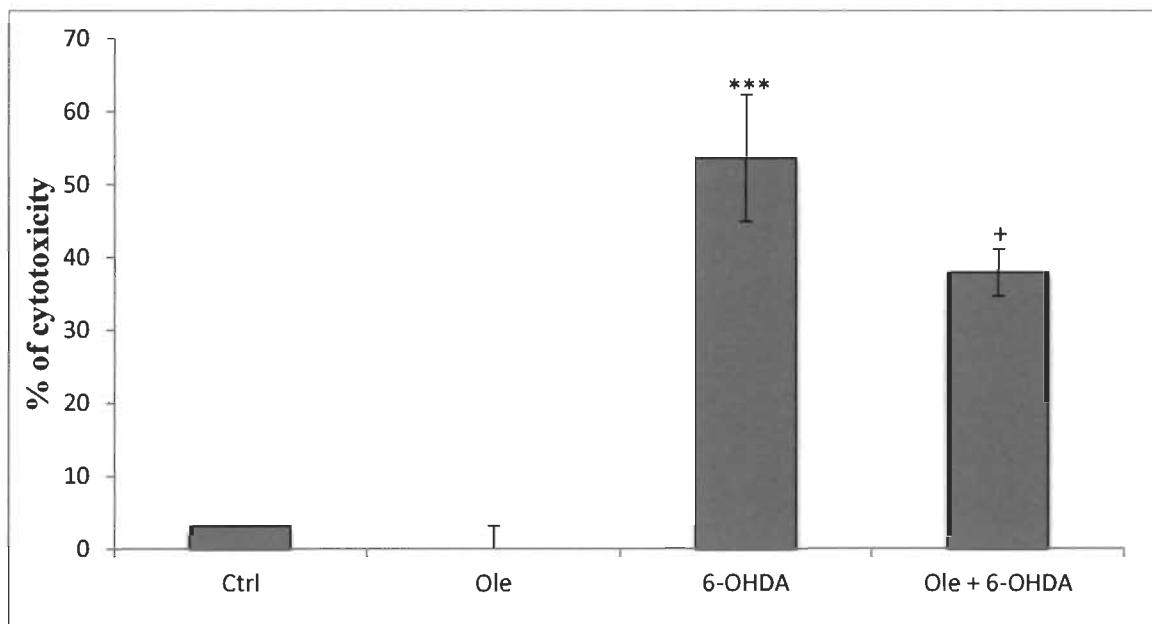
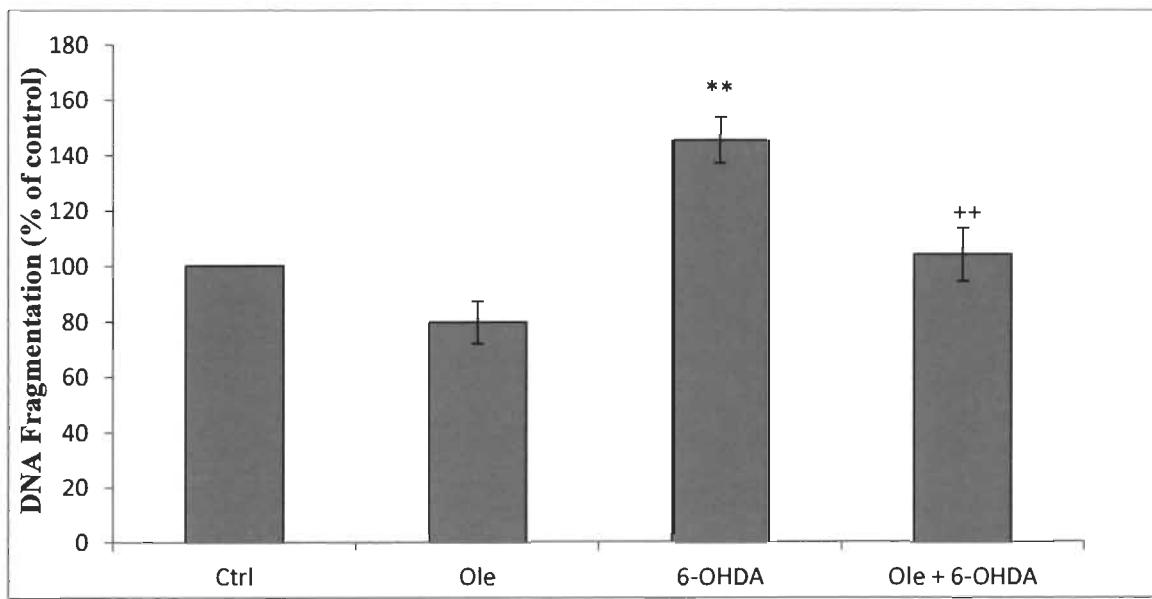
**Fig. 3.** Epifluorescence visualization of autophagic vacuoles using Cyto-ID detection Kit. Cells were pre-treated with oleuropein  $10^{-12}$  M and treated with 6-OHDA 20  $\mu$ M for 24 h. A significant increase of fluorescent signal is observed in PC12 cells pre-treated with Ole.

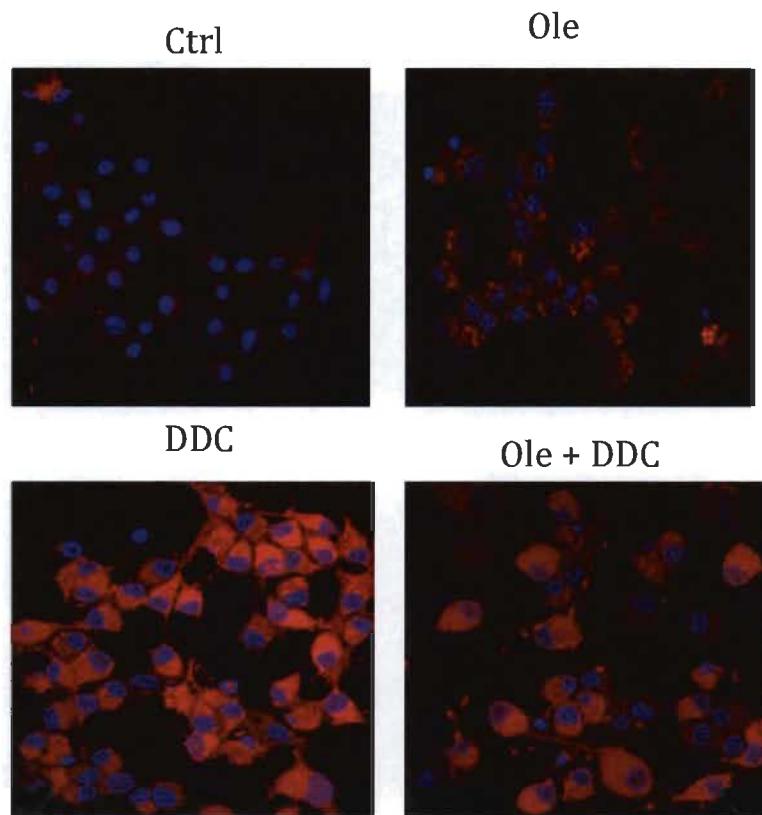
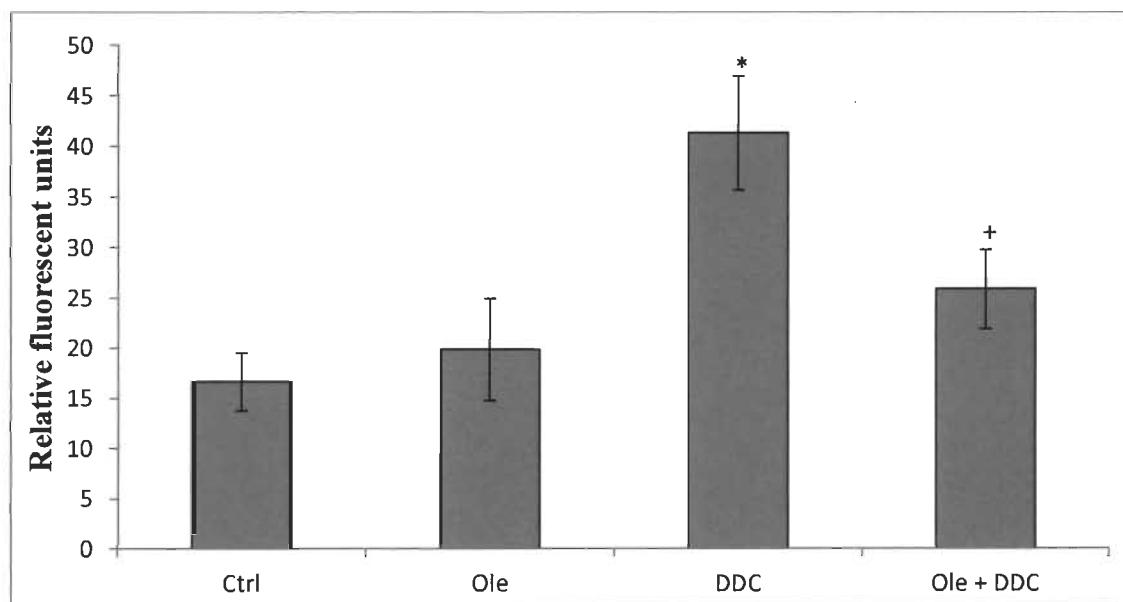
**Fig. 4.** Double-staining immunofluorescence using antibodies for HDAC6 (green) and LC3 (red). Immunofluorescence illustrates that the number of fluorescent vesicles are higher in PC12 cells treated with Bafilomycin.

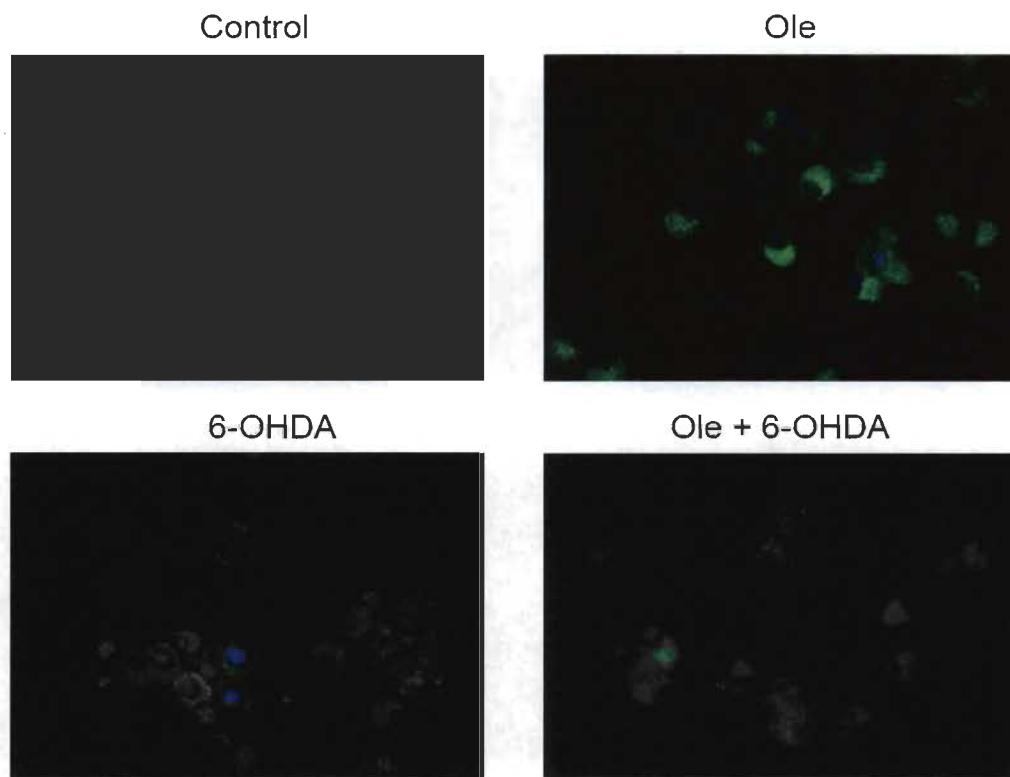
**Fig. 5A.** Western Blot analysis of LC3 levels. Ole didn't increase LC3 expression compared to control. After the treatment of neuronal PC12 cells with Baf, the level of LC3 was significantly higher. The administration of Ole + Baf did not change the amount of LC3. n=3 \*\*P < 0.01 compared to control and  $^{++}P < 0.01$  compared to Baf.

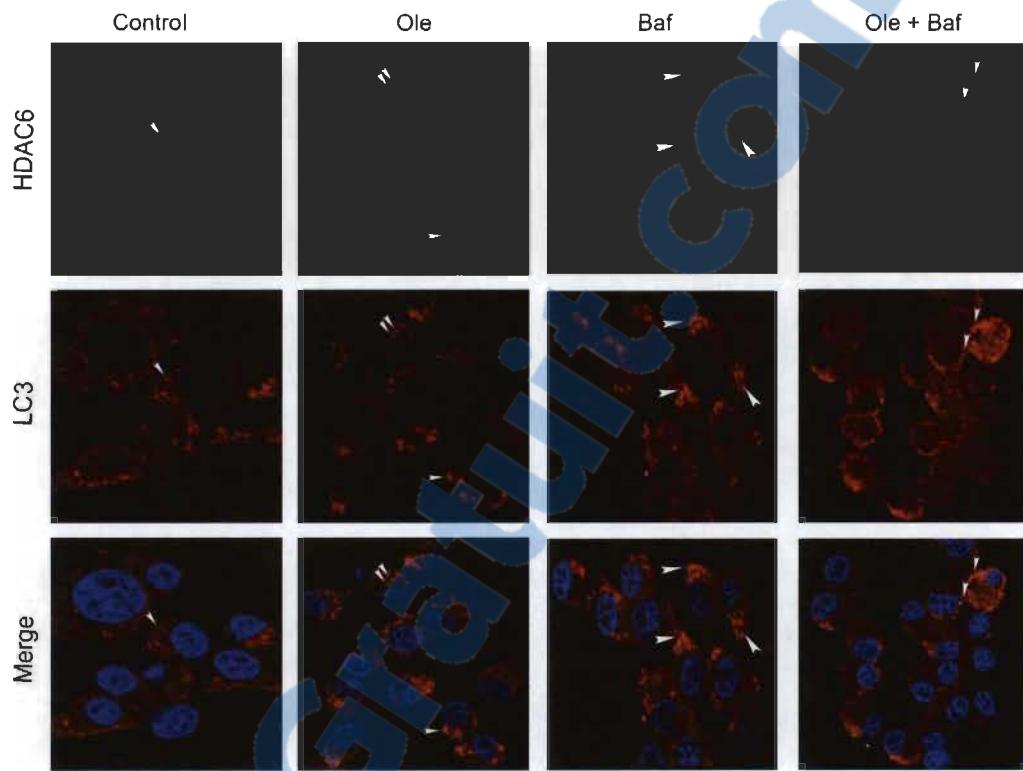
**B.** Western Blot analysis of p62 levels. Ole treatment did not increase p62 expression. Treatment of Baf strongly increased p62 expression and administration of Ole + Baf did not change p62 levels. n=3 \*\*P < 0,01 compared to control and ++P < 0.01 compared to Baf.

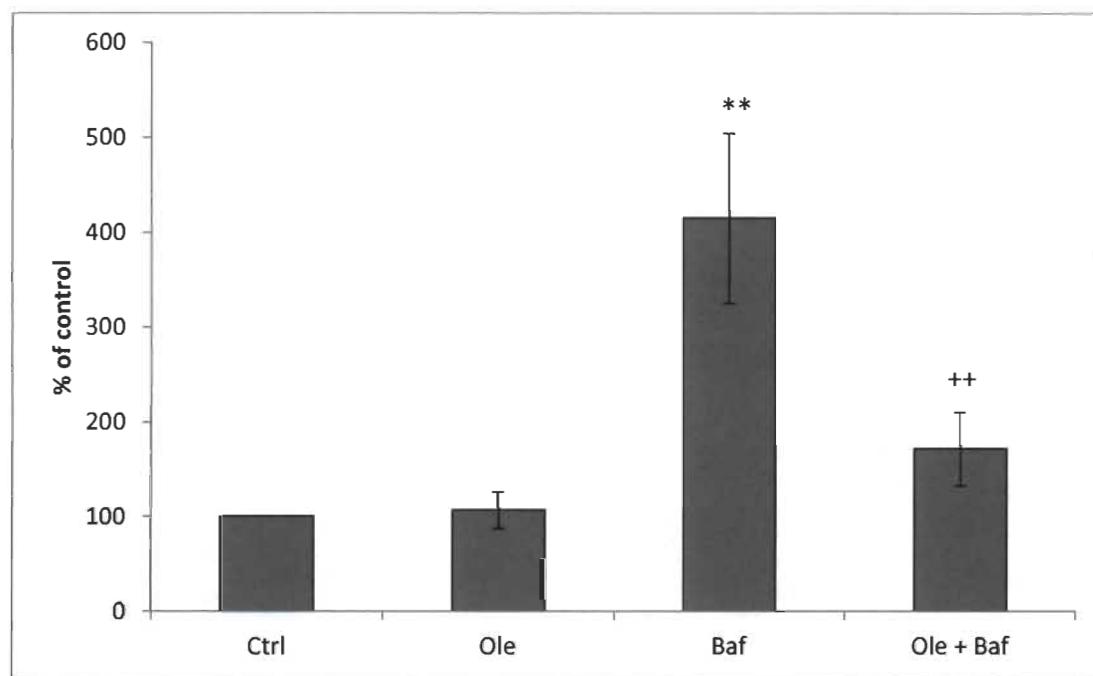
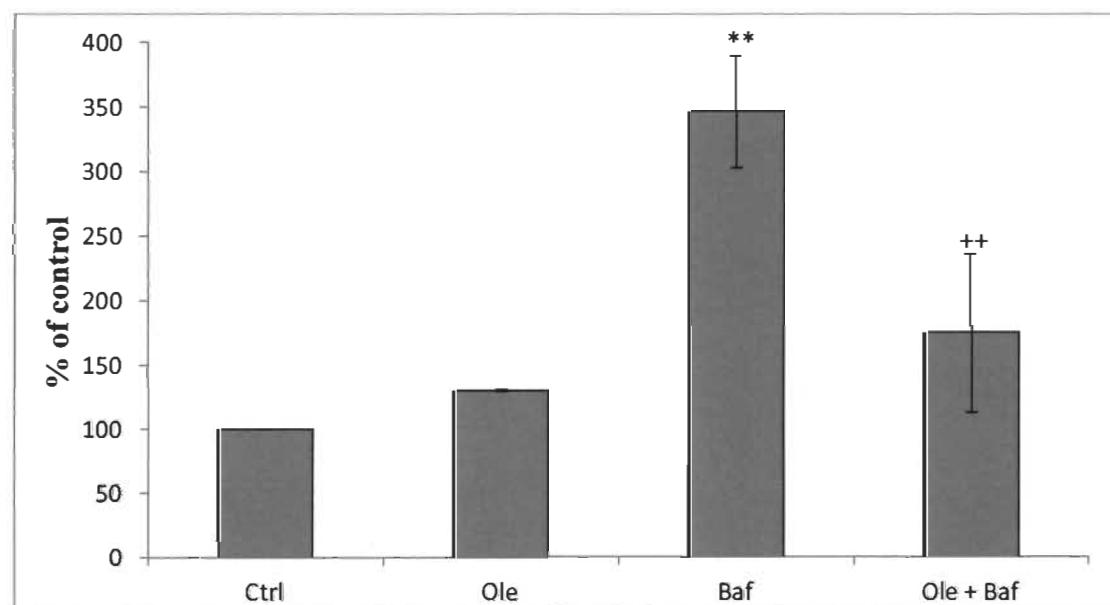
**Fig. 6.** Double staining immunofluorescence using antibodies for LAMP2 (green) and mtHSP70 (red) to visualize lysosomes and mitochondria, respectively. Immunofluorescence illustrates that Ole reverts abnormal relocalization of lysosomes and mitochondria induced by 6-OHDA.

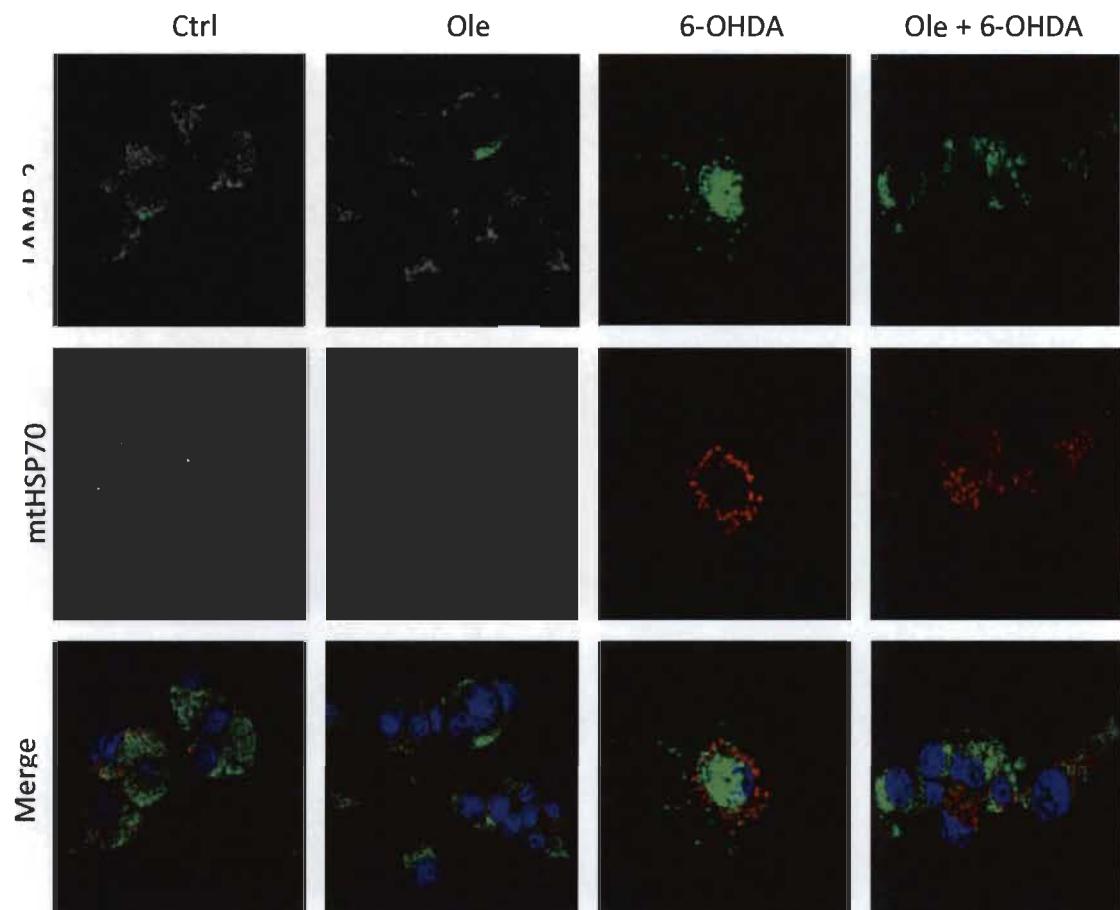
**Figures****Figure 1A****Figure 1B**

**Figure 2A****Figure 2B**

**Figure 3**

**Figure 4**

**Figure 5A****Figure 5B**

**Figure 6**

## **CHAPITRE III**

### **CONCLUSION**

Les recherches qui ont été effectuées durant ce projet de maîtrise avaient pour but de tester le potentiel neuroprotecteur de l'oleeuropéine, un polyphénol naturel, sur un modèle cellulaire de la maladie de Parkinson; des cellules PC12 différencierées en neurones et exposées à la neurotoxine 6-OHDA.

Cet objectif découle de plus de quinze ans de recherche sur le rôle neuroprotecteur et antioxydant de plusieurs molécules naturelles entreprises dans le laboratoire de neurobiologie cellulaire de l'UQTR, où j'ai poursuivi mes études de maîtrise. En effet, des molécules à fort pouvoir antioxydant sont présentes dans les végétaux, par exemple les polyphénols qui y sont présents de façon ubiquitaire. Ces derniers ont fait l'objet de nombreuses recherches, et les résultats applicables à la santé humaine sont très prometteurs. Par exemple, la consommation de polyphénols dans l'alimentation est associée à un moindre risque de développer des pathologies, comme les maladies cardiovasculaires, certaines formes de cancer, et des maladies neurodégénératives. Ces polyphénols exercent leurs bienfaits sur la santé en agissant autant qu'antioxydants naturels, mais pas seulement. Il s'est avéré que ces molécules peuvent interagir avec des voies de signalisation cellulaires qui régulent les fonctions cellulaires dans les conditions normales et pathologiques (Vauzour 2010). Parmi ces polyphénols prometteurs, l'Oe a été choisi puisque dans la littérature scientifique, cette molécule a démontré de nombreuses propriétés intéressantes pour de futures applications thérapeutiques dans le but de contrecarrer la neurodégénérescence.

L'Oe est considérée comme étant un puissant antioxydant puisqu'elle est capable de neutraliser les radicaux libres qui sont liés à un haut risque de maladies cardiovasculaires et au vieillissement des cellules en général. L'athérosclérose est également un facteur impliqué dans la pathologie des maladies cardiovasculaires, ce qui

consiste en la formation de plaques de cholestérol, communément appelées plaques d'athérome. L'Oe de par sa capacité à réduire les taux plasmatiques de cholestérol total, libre et estérifié, joue donc le rôle d'antiathérogène. La feuille d'olivier a aussi été longtemps utilisée comme antibiotique naturel puisqu'elle possède des propriétés antimicrobiennes. Cependant, le mécanisme d'action sous-jacent cette propriété n'est pas encore bien connue, mais plusieurs hypothèses ont été proposées. Concernant la neuroprotection, cette molécule naturelle a aussi démontré des bienfaits contre l'ischémie cérébrale et les blessures de la moelle épinière (Bulotta 2014).

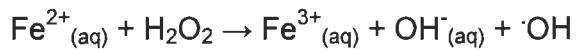
Dans un contexte de neuroprotection, le choix du modèle de travail est aussi très important. Nous avons choisi les cellules PC12. La lignée cellulaire PC12 est dérivée à partir d'un phéochromocytome de rat, elle a été utilisée pendant près de 30 ans comme outil dans de nombreux aspects de la neurobiologie. Puisque ces cellules sont prélevées de la partie médullaire des glandes surrénales, elles ont la capacité de synthétiser des catécholamines, dont la dopamine (DA). On sait que la DA est le neurotransmetteur d'intérêt dans la MP puisque la dégénérescence caractéristique de la MP touche principalement les neurones dopaminergiques mésencéphaliques. Un autre avantage de ces cellules est qu'elles répondent au *Nerve Growth Factor* (NGF), un facteur de croissance des nerfs. En effet, les cellules PC12 traitées au NGF arrêtent de proliférer et acquièrent des propriétés phénotypiques de neurones dopaminergiques.

Mes résultats ont effectivement démontré que l'Oe, exerçait un effet neuroprotecteur sur des neurones dopaminergiques *in vitro*. Nous avons aussi vérifié les propriétés antioxydantes de l'Oe. Les résultats relatifs à ce projet seront discutés plus en détail dans les paragraphes qui suivront.

Afin de tester le potentiel neuroprotecteur de l'Oe, nous avons utilisé le test de la LDH qui permet de mesurer le taux de mort cellulaire, ainsi que le test de fragmentation de l'ADN (ssDNA). Quant à ce dernier, il permet de quantifier spécifiquement l'apoptose et son principe se base sur la propriété du formamide à dénaturer spécifiquement l'ADN dans des cellules apoptotiques, mais pas dans les cellules nécrotiques ou dans les

cellules présentant des cassures de l'ADN en absence d'apoptose (Frankfurt 2001). La sensibilité de l'ADN au formamide dans des cellules apoptotiques n'est pas liée à des cassures au niveau de l'ADN, mais reflète plutôt des changements dans la chromatine associés à l'apoptose, tels que la condensation de la chromatine et la digestion des protéines stabilisantes d'ADN.

Nous avons observé qu'un pré-traitement de 3 h avec l'Oe à une concentration de 1 nM, diminuait significativement la cytotoxicité ainsi que l'apoptose induite par la 6-OHDA. Ces résultats sont en lien avec les capacités antioxydantes de l'Oe qui ont fait l'objet de plusieurs recherches *in vitro* (Visioli 1998) et *in vivo* (Coni 2000, Sarbishegi 2014). Plus précisément, il a été démontré que le groupement catéchol de l'Oe est grandement responsable de ses propriétés antioxydantes. Premièrement, il permet de piéger des radicaux libres grâce à ses deux fonctions hydroxyl en ortho qui font de lui un bon donneur d'électrons. Les radicaux libres sont ensuite transformés en molécules moins toxiques. Par exemple, lorsque le radical hydroxyl est piégé par le groupement catéchol, il est transformé en eau. Après avoir donné un électron, il devient lui-même un radical, mais le cycle aromatique permet de stabiliser cet électron réactif en le déplaçant autour de sa structure. Deuxièmement, le groupement catéchol de l'Oe peut chélater des métaux de transition (Rietjens 2007). Ceci est particulièrement intéressant pour la maladie de Parkinson où on sait que les niveaux de fer (Fe<sup>2+</sup>) élevés dans la substance noire sont propices à catalyser la formation de radicaux libres selon la réaction de Fenton.



Bien que les propriétés antioxydantes de l'Oe soient bien connues, nous avons jugé important de vérifier cet effet sur notre modèle, les cellules PC12 différencierées parce que peu de littérature s'intéresse à l'action de l'Oe dans des cellules nerveuses. Pour cela, j'ai estimé la production intracellulaire d'anion superoxyde •O<sub>2</sub><sup>-</sup> avec le test de MitoSox. Ce colorant fluorogène est un indicateur hautement sélectif de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> dans les mitochondries des cellules vivantes. Il cible rapidement et de manière sélective les

mitochondries. Une fois dans les mitochondries, il est oxydé par  $\cdot\text{O}_2^-$  et présente une fluorescence rouge.

Les résultats ont effectivement démontré qu'un pré-traitement de 3 h avec 1 nM d'Oe réduit la production de l'anion superoxyde induite par le diethyldithiocarbamate (DDC), qui est une molécule qui inhibe l'enzyme superoxyde dismutase. Cette dernière inactive l'ion superoxyde en le transformant en peroxyde d'hydrogène. Et on sait que la chaîne de production des radicaux libres a comme point de départ l'ion superoxyde. La superoxyde dismutase est donc considérée comme l'un des principaux facteurs impliqués dans la défense contre les radicaux libres (Menvielle-Bourg 2005). Nous concluons que notre molécule neuroprotectrice réverse aussi l'oxydation induite par le DDC sur les cellules PC12 différencierées.

Cependant, nous ne sommes pas arrêtés là, puisque dans la recherche, le commencement d'un nouveau projet est semblable au fait d'entamer un nouveau livre. On ne peut s'arrêter avant de connaître la suite de l'histoire. Nous nous sommes donc penchés plus en détail sur le potentiel neuroprotecteur de l'Oe. En effet, nous avons émis l'hypothèse que le processus de l'autophagie pourrait avoir une implication ou un rôle à jouer dans l'histoire. L'autophagie étant impliquée dans l'élimination et le remplacement des organites non fonctionnels, il est considéré comme un mécanisme physiologique important au développement et au bien-être des neurones.

Par conséquent, nous avons étudié l'impact de l'Oe sur l'autophagie des cellules PC12 différencierées en neurones. À cette fin, j'ai utilisé le kit Cyto-ID qui permet de visualiser les vacuoles produites durant le processus de l'autophagie, comme décrit dans la section « Materials and methods » de l'article. En observant les résultats obtenus (Figure 3 de l'article), on remarque qu'il y a plus de vacuoles autophagiées dans les cellules pré-traitées avec 1 nM d'Oe comparé à celles traitées seulement avec la 6-OHDA. Cela pourrait être dû à une induction accrue ou une limitation de la dégradation liée à l'autophagie et donc une accumulation des vacuoles. Cependant, ces observations résultent d'une analyse qualitative. J'ai donc procédé à une

immunofluorescence en utilisant anti-LC3 et anti-HDAC6, ce sont des marqueurs spécifiques utilisés afin de suivre le processus de l'autophagie. Leurs rôles ont été abordés plus en détail dans l'introduction. Durant cette expérience, la Bafilomycine (Baf) a été utilisée comme contrôle positif puisqu'elle inhibe la fusion des autophagosomes et lysosomes, ce qui induit une accumulation des vacuoles autophagiennes. On remarque dans la figure 5 de l'article qu'effectivement le plus grand nombre de vacuoles autophagiennes semble être dans la condition Baf. Le niveau de LC3 semble être moindre dans les autres conditions, mais cette analyse qualitative ne nous a pas permis de voir s'il y avait des différences entre les trois autres conditions (Ctrl, Oe, Oe + Baf). C'est pourquoi on a voulu faire une analyse plus quantitative des protéines avec des Western Blots en utilisant toujours l'anticorps anti-LC3 mais aussi un autre marqueur l'anti-p62.

La figure 5A de l'article représente l'analyse semi-quantitative des niveaux de LC3 par Western Blot. Ces résultats confirment la constatation faite à partir de l'immunofluorescence. Effectivement, le plus haut niveau de LC3 est observé dans la condition Baf. Cependant, l'Oe ajoutée à la Baf n'augmente pas le niveau de LC3 par rapport à l'Oe. La figure 5B de l'article montre l'analyse par Western Blot du niveau de p62. Ces résultats concordent avec ceux de LC3 puisqu'ici encore l'administration de l'Oe avec la Baf ne change pas les niveaux de p62 par rapport à l'administration de l'Oe seule. De plus, on remarque que l'expression de p62 a diminué après l'ajout de l'Oe, ce qui laisse à penser que l'Oe agit sur l'expression de p62. Ces résultats réunis nous suggèrent que l'Oe peut réduire l'induction et la dégradation liée à l'autophagie et semble aussi réguler le niveau de p62.

Comme déjà mentionné plus haut dans ce mémoire, l'autophagie contribue de manière importante à l'homéostasie de la cellule. Effectivement, son activation permet une production énergétique suffisante au maintien des fonctions vitales lors de conditions pauvres en nutriments (Puyal 2009). Cependant, le maintien d'un niveau approprié de ce processus biologique est important pour s'assurer que son activité est soigneusement contrôlée dans les paramètres physiologiques (Lynch-Day 2012).

Cela permettra de minimiser les agrégats de protéines anormales et de faciliter le renouvellement des organites tout en évitant une digestion anormale de constituants essentiels de la cellule, ce qui pourrait s'accompagner de la mort cellulaire, appelée dans ce cas auto-cannibalisme. L'autophagie présente donc un rôle paradoxal. Banerjee *et al.* suggèrent dans leur article qu'une contribution bénéfique ou néfaste de l'autophagie dans la pathogenèse de troubles neurodégénératifs pourrait strictement s'appuyer sur précisément quand (l'aspect temporel), où (la fonction spatiale) et combien (la quantité), survient son activation.

Les mitochondries sont des organites qui jouent un rôle primordial dans la vie et la mort cellulaire. Effectivement, ces organites présents dans les cellules des organismes eucaryotes sont impliqués dans de nombreuses fonctions : production d'ATP, synthèse de stéroïdes hormonaux à partir du cholestérol, turnover de monoamines, séquestration de  $\text{Ca}^{2+}$  et participation à la mort cellulaire programmée (apoptose) par relâche de molécules apoptogènes dans le cytoplasme (cytochrome c, caspases...) (Kramer 2012).

Tel que mentionné dans la sous-sous-section 1.1.4.2 de ce mémoire, la dysfonction ou l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale entraîne un déséquilibre entre la production d'ERO et les capacités antioxydantes de l'organisme, ce qui résulte en des lésions cellulaires (Bonnefont-Rousselot 2007). Une cellule peut maintenir des mitochondries fonctionnelles grâce à un mécanisme important appelé mitophagie. La mitophagie est une forme spécialisée de l'autophagie qui élimine les mitochondries endommagées, maintenant ainsi un métabolisme cellulaire efficace et réduisant le stress oxydatif (Dolman 2013). La dégradation sélective des mitochondries endommagées ou inutiles est un domaine en croissance dans le développement, le cancer, et les maladies neurodégénératives, en particulier à l'égard de la maladie de Parkinson (MP) (Zhu 2011).

Mais encore, qu'en est-il du lysosome? Cet organite qui joue un rôle crucial dans le processus de l'autophagie. Les lysosomes sont présents dans les organismes eucaryotes, leur membrane contient des canaux ioniques (des pompes à protons) qui permettent l'entrée active d'ions  $\text{H}^+$ , et ceci afin de maintenir un pH acide (entre 3,5 et 5) au sein de

la vésicule lysosomale. Le lysosome contient un ensemble d'enzymes capables de dégrader tous les types de polymères de protéines biologiques, des acides nucléiques, des glucides et des lipides. Des mutations dans les gènes qui codent pour ces enzymes sont responsables de plus de 30 maladies génétiques humaines différentes, qui sont appelées maladies de surcharge lysosomale parce que le matériel non dégradé s'accumule dans les lysosomes des personnes affectées. En plus de la dégradation des molécules prises par endocytose, les lysosomes digèrent du matériel provenant de deux autres voies : la phagocytose et l'autophagie. Dans l'autophagie, les organites tels que les mitochondries sont entourés par les autophagosomes. Les phagosomes et les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes pour former des phagolysosomes, dans lesquels leur contenu est dégradé (Cooper 2000). L'homéostasie cellulaire implique l'équilibrage des besoins énergétiques d'une cellule. Cela comprend la production d'énergie, de nouvelles macromolécules et de nouveaux organites. Mais elle implique aussi leur dégradation et leur recyclage. L'organisme tout entier peut être affecté par des cellules qui ont des lysosomes dysfonctionnels. Il a été démontré que trois types de déficiences lysosomales génétiques pouvaient générer le parkinsonisme ou la MP, incluant un déficit dans la fonction de la membrane lysosomale, la dégradation des glycolipides et protéines. Tout d'abord, la perte de fonction de protéines membranaires lysosomales neuronale de type P ATPase, ATP13A2, sous-tend une forme autosomique récessive de la MP ayant une apparition précoce avec dégénérescence pyramidale et démence. Concernant les déficits des enzymes responsables de la dégradation des glycolipides, cela cause une agrégation de l'alpha-synucléine dans les neurones et les cellules gliales (Schneider 2010).

Connaissant ainsi l'importance des lysosomes et des mitochondries dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, nous avons voulu voir si notre molécule neuroprotectrice avait un effet sur la mitochondrie et le lysosome qui est communément appelé « centre de recyclage de la cellule ». À cette fin, j'ai réalisé une immunofluorescence en utilisant des anticorps dirigés contre mtHSP70 et LAMP2 respectivement. Les images réunies dans la figure 6 de l'article nous indiquent que dans la première condition (Ctrl), les lysosomes et les mitochondries sont dispersés dans le

cytoplasme. Par contre après l'administration de la neurotoxine 6-OHDA, les lysosomes se sont concentrés autour du noyau alors que les mitochondries étaient localisées autour des lysosomes. L'Oe contribue donc au maintien de la bonne distribution lysosomale et mitochondriale au sein du cytoplasme. Le mécanisme sous-jacent cet effet protecteur est probablement lié à l'effet antioxydant de l'Oe qui a résulté en une diminution de l'apparition des radicaux libres comme montré dans les résultats obtenus ainsi que dans la littérature précédente (Visioli 1998, Coni 2000, Andreadou 2006).

De ces résultats réunis, on conclut que l'Oe est une molécule neuroprotectrice qui pourrait donc être utilisée autant que traitement préventif ou en thérapie complémentaire aux autres médicaments symptomatiques. D'autant plus qu'elle exerce son effet à de faibles doses, qu'elle est très bio-disponible (Syed Haris 2010) et qu'elle passe la barrière hémato-encéphalique (Serra 2012). De plus, l'Oe a un effet antioxydant sur les cellules PC12 neuronales, et agit sur le mécanisme de l'autophagie.

Pour les perspectives à long terme de la recherche sur l'Oe, nous pourrions voir l'effet de l'Oe *in vivo* sur des modèles animaux classiques de la MP, des souris exposées à la neurotoxine 1 - méthyle 4 - phényl 1,2,3,6-tétrahydro pyridine (MPTP). Le but sera d'évaluer la survie cellulaire ainsi que les comportements moteurs des souris exposées à la neurotoxine MPTP et à l'Oe à titre préventif. Les déficits de ces souris parkinsoniennes pourraient être évalués par des tests comportementaux visant la motricité, mais aussi bien la socialité et la démence. Ensuite, l'évaluation de la survie cellulaire pourrait se faire à l'aide de techniques d'immunofluorescence ou d'immunohistochimie après sacrifices des souris.

Ces dernières années, les recherches qui concernent les relations entre aliments et maladies ne font qu'accroître de façon considérable. En effet, de nombreuses études ont suggéré que les fruits et légumes, ainsi que les acides gras essentiels avaient un rôle important à jouer dans la protection contre les maladies (Virmani 2013). Effectivement, la nutrition est devenue un facteur important pour la santé humaine, comme l'a dit Hippocrate : « Que ton aliment soit ta seule médecine ». D'ailleurs, l'observation ou

l'investigation de régimes alimentaires de certaines régions du monde où la présence de maladies chroniques était moindre a permis à de nombreux chercheurs de découvrir des molécules naturelles responsables de ce taux moindre de maladies, et par la suite de comprendre plusieurs mécanismes reliés à ces pathologies. Et l'on sait que la compréhension des mécanismes sous-jacents la maladie ouvre la voie à la découverte de son traitement. Par exemple, dans les années 90, des chercheurs ont constaté que bien que les Français avaient une alimentation aussi riche en lipides que celle des Américains et qu'ils avaient les mêmes facteurs de risque pour les maladies cardiovasculaires, le taux de décès à cause de ces maladies présentait toutefois un taux plus faible chez les Français comparé à ce qui est observé chez les Américains. Cet étrange constat fut appelé « paradoxe français » (Renaud 1992). La réponse à ce paradoxe était la découverte des bienfaits des polyphénols contenus dans le vin rouge, en particulier le resvératrol. Ce dernier est trouvé dans la peau des raisins, les bleuets, les framboises et les mûres. Notre laboratoire a démontré que le resvératrol réduit l'expression de deux gènes pro-inflammatoires, l'IL-1 $\alpha$  et TNF $\alpha$  dans des cellules microgliales N9, cette molécule réduit donc la mort neuronale causée par la neuroinflammation (Bureau 2008). En suivant ces pistes de réflexion, il est envisageable de tester les possibles effets anti-inflammatoires de l'Oe dans un modèle de co-culture microglia-neurone. De plus, l'Oe pourrait facilement être administrée *in vivo* et ainsi confirmer les résultats déjà obtenus *in vitro* dans le présent mémoire. Comme déjà démontré pour le resvératrol, l'efficacité de l'Oe dans le traitement des maladies neurodégénératives dépend de la biodisponibilité de ses métabolites et de leur capacité à influencer à la fois les voies de signalisation dépendantes et indépendantes de sirtuines chez l'homme (Anekonda 2006). Ces dernières sont un groupe d'histone désacétylases dont les activités dépendent et sont régulées par la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD $^{+}$ ). Elles ont une fonction régulatrice de l'expression des gènes, elles régulent positivement un ensemble restreint de protéines liées aux mécanismes du métabolisme énergétique et pro-survie, et jouent donc un rôle clé dans les effets de la longévité suscitée par la restriction calorique (Zhang 2011).

La neuroprotection peut entraîner une récupération ou la régénération du système nerveux, ses cellules, leur structure et leur fonction (Vajda 2002). Elle constitue donc sans doute une stratégie thérapeutique plus efficace que les traitements purement symptomatiques utilisés en ce moment pour la maladie de Parkinson.

L'identification de l'Oe comme molécule neuroprotectrice et la connaissance approfondie de son mécanisme d'action seraient une étape importante dans le traitement de cette pathologie neurodégénérative. Le simple fait d'introduire un agent neuroprotecteur comme supplément à sa diète pourrait modifier le cours de progression de la maladie, ou même réduire le risque de son apparition puisqu'il permettrait de protéger les neurones contre les molécules toxiques sans pour autant occasionner des effets secondaires néfastes comme c'est le cas des médicaments utilisés en ce moment.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alexandra Dürr, C. L., Alexis Brice (2000). « La maladie de Parkinson due aux mutations de parkine ». médecine/sciences **16**.
- Andreadou, I., E. K. Iliodromitis, E. Mikros, M. Constantinou, A. Agalias, P. Magiatis, A. L. Skaltsounis, E. Kamber, A. Tsantili-Kakoulidou and D. T. Kremastinos (2006). “The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits”. J Nutr **136**(8): 2213-2219.
- Andrew J Hughes, S. E. D., Linda Kilford, Andrew J Lees (1992). “Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson’s disease. A clinico-pathological study of 100 cases”. Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry **55**: 181-184.
- Axe, E. L., S. A. Walker, M. Manifava, P. Chandra, H. L. Roderick, A. Habermann, G. Griffiths and N. T. Ktistakis (2008). “Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum”. The Journal of Cell Biology **182**(4): 685-701.
- Barbaro, B., G. Toietta, R. Maggio, M. Arciello, M. Tarocchi, A. Galli and C. Balsano (2014). “Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health”. Int J Mol Sci **15**(10): 18508-18524.
- Barth, S., D. Glick and K. F. Macleod (2010). “Autophagy: assays and artifacts”. J Pathol **221**(2): 117-124.
- Bazoti, F. N., J. Bergquist, K. E. Markides and A. Tsarbopoulos (2006). “Noncovalent interaction between amyloid-beta-peptide (1-40) and oleuropein studied by electrospray ionization mass spectrometry”. J Am Soc Mass Spectrom **17**(4): 568-575.
- Benitez, J., J. M. Ladero, F. J. Jimenez-Jimenez, C. Martinez, A. M. Puerto, M. J. Valdivielso, A. Llerena, J. Cobaleda and J. J. Munoz (1990). “Oxidative polymorphism of debrisoquine in Parkinson’s disease”. J Neurol Neurosurg Psychiatry **53**(4): 289-292.
- Bjorkoy, G., T. Lamark, S. Pankiv, A. Overvatn, A. Brech and T. Johansen (2009). “Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1”. Methods Enzymol **452**: 181-197.

Bonnefont-Rousselot, D. (2007). « Stress oxydant et vieillissement ». Spectra biologie **157**.

Brinda Ravikumar, K. M., Luca Jahreiss, Claudia Puri & David C. Rubinsztein (2010). “Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures”. Nature Cell Biology **12**: 747-757.

Bulotta, S., M. Celano, S. M. Lepore, T. Montalcini, A. Pujia and D. Russo (2014). “Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases”. J Transl Med **12**: 219.

Canada, S. d. P. (2014). « Qu'est-ce que la maladie de Parkinson? » <http://www.parkinson.ca>

Chen, X. L., Y. Y. Xiong, G. L. Xu and X. F. Liu (2013). “Deep brain stimulation”. Interv Neurol **1**(3-4): 200-212.

Chung, C. Y., J. B. Koprich, H. Siddiqi and O. Isacson (2009). “Dynamic changes in presynaptic and axonal transport proteins combined with striatal neuroinflammation precede dopaminergic neuronal loss in a rat model of AAV alpha-synucleinopathy”. J Neurosci **29**(11): 3365-3373.

CM, T. (1992). “Epidemiology of Parkinson's disease”. Neurol Clin **10**(2): 317-329.

Coni, E., R. Di Benedetto, M. Di Pasquale, R. Masella, D. Modesti, R. Mattei and E. A. Carlini (2000). “Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits”. Lipids **35**(1): 45-54.

Corti, O. and A. Brice (2003). “[Parkinson's disease: what have we learned from the genes responsible for familial forms?]”. Med Sci (Paris) **19**(5): 613-619.

Cuervo, A. M., L. Stefanis, R. Fredenburg, P. T. Lansbury and D. Sulzer (2004). “Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy”. Science **305**(5688): 1292-1295.

Daccache, A., C. Lion, N. Sibille, M. Gerard, C. Slomianny, G. Lippens and P. Cotelle (2011). “Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors”. Neurochem Int **58**(6): 700-707.

Davis, G. C., A. C. Williams, S. P. Markey, M. H. Ebert, E. D. Caine, C. M. Reichert and I. J. Kopin (1979). “Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues”. Psychiatry Res **1**(3): 249-254.

- Dawson, T. M. and V. L. Dawson (2003). "Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease". Science **302**(5646): 819-822.
- de la Puerta, R., V. Ruiz Gutierrez and J. R. Hoult (1999). "Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil". Biochem Pharmacol **57**(4): 445-449.
- De Lau, L. M. L. and M. M. B. Breteler (2006). "Epidemiology of Parkinson's disease". The Lancet Neurology **5**(6): 525-535.
- Del Boccio, P., A. Di Deo, A. De Curtis, N. Celli, L. Iacoviello and D. Rotilio (2003). "Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol in rat plasma and urine after oral administration". J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **785**(1): 47-56.
- Erin H Norris, B. I. G., Virginia M.-Y Lee (2004). " $\alpha$ -Synuclein: Normal Function and Role in Neurodegenerative Diseases". Current Topics in Developmental Biology **60**: 17-54.
- Ferré, S. (2008). "An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine". Journal of Neurochemistry **105**: 1067-1079.
- Ford, B. (2009). "Parkinson disease: Pain in Parkinson disease: the hidden epidemic". Nat Rev Neurol **5**(5): 242-243.
- Garcia-Reitbock, P., O. Anichtchik, A. Bellucci, M. Iovino, C. Ballini, E. Fineberg, B. Ghetti, L. Della Corte, P. Spano, G. K. Tofaris, M. Goedert and M. G. Spillantini (2010). "SNARE protein redistribution and synaptic failure in a transgenic mouse model of Parkinson's disease". Brain **133**(Pt 7): 2032-2044.
- Greenamyre, J. T., T. B. Sherer, R. Betarbet and A. V. Panov (2001). "Complex I and Parkinson's disease". IUBMB Life **52**(3-5): 135-141.
- Groiss, S. J., L. Wojtecki, M. Sudmeyer and A. Schnitzler (2009). "Deep brain stimulation in Parkinson's disease". Ther Adv Neurol Disord **2**(6): 20-28.
- Hai-Wei Tan, K. L. T., Ieva Stupans, Peter J Hayball (2003). "Simultaneous determination of oleuropein and hydroxytyrosol in rat plasma using liquid chromatography with fluorescence detection". Journal of Chromatography B **785**: 187-191.

Hamzeh Pasban-Aliabadi, S. E.-M., Vahid Sheibani, Mehdi Abbasnejad, Anahita Mehdizadeh, and Mohammad Mehdi Yaghoobi (2013). "Inhibition of 6-Hydroxydopamine-Induced PC12 Cell Apoptosis by Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Extract Is Performed by Its Main Component Oleuropein". Rejuvenation Research **16**(2): 134-142.

Han, J., T. P. Talorete, P. Yamada and H. Isoda (2009). "Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells". Cytotechnology **59**(1): 45-53.

Hanrott, K., L. Gudmunsen, M. J. O'Neill and S. Wonnacott (2006). "6-hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase Cdelta". J Biol Chem **281**(9): 5373-5382.

Hirsch, E. C. and S. Hunot (2009). "Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?" Lancet Neurol **8**(4): 382-397.

Jenner P, D. D., Sian J, Schapira AH, Marsden CD. (1992). "Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group". Ann Neurol **32**: 82-87.

Jones R. (2010). "The Roles of PINK1 and Parkin in Parkinson's Disease". PLoS Biology **8**(1): e1000299.

Kajava A, L. J. (2013). « Quand les protéines s'agrègent dans le cerveau Parkinson ». Pour la Science **428**.

Kazlauskaitė, A., Muqit, Miratul M. K. (2015). "PINK1 and Parkin - mitochondrial interplay between phosphorylation and ubiquitylation in Parkinson's disease". FEBS Journal **282**(2): 215-223.

Lee, J. K., Tran, T., Tansey M. (2009). "Neuroinflammation in parkinson's disease". J Neuroimmune Pharmacol **4**(4): 419-429.

Lee, J. Y., H. Koga, Y. Kawaguchi, W. Tang, E. Wong, Y. S. Gao, U. B. Pandey, S. Kaushik, E. Tresse, J. Lu, J. P. Taylor, A. M. Cuervo and T. P. Yao (2010). "HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy". EMBO J **29**(5): 969-980.

Lepage, C. (2012). « Les symptômes non moteurs, la face cachée de la maladie de Parkinson ». Le Médecin du Québec **47**.

Levy, O. A., C. Malagelada and L. A. Greene (2009). "Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps". *Apoptosis* **14**(4): 478-500.

Lincoln, S., J. Wiley, T. Lynch, J. W. Langston, R. Chen, A. Lang, E. Rogaeva, D. S. Sa, R. P. Munhoz, J. Harris, K. Marder, C. Klein, G. Bisceglie, J. Hussey, A. West, M. Hulihan, J. Hardy and M. Farrer (2003). "Parkin-proven disease: common founders but divergent phenotypes" *Neurology* **60**(10): 1605-1610.

Luc Defebvre, M. V. (2011). *La maladie de Parkinson 2<sup>e</sup> édition*. Elsevier Masson. ISBN: 9782294711534

Matthias, O. T. a. P. (2012). "Interplay between histone deacetylases and autophagy - from cancer therapy to neurodegeneration". *Immunology and Cell Biology* **90**: 78-84.

Michael A Nalls, V. P., Dena G Hernandez, Manu Sharma,, M. S. Una-Marie Sheerin, J Simón-Sánchez, Claudia Schulte, Suzanne Lesage, Sigurlaug Sveinbjörnsdóttir, Kári Stefánsson, Maria Martinez, John Hardy, Peter Heutink, Alexis Brice, and A. B. S. Thomas Gasser, Nicholas W Wood (2011). "Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies". *The Lancet* **377**(9766): 641-649.

Michel, P. P., E. C. Hirsch and Y. Agid (2002). "Parkinson disease: mechanisms of cell death". *Rev Neurol (Paris)* **158 Spec no 1**: S24-32.

Mizushima, N. (2007). "Autophagy: process and function". *Genes Dev* **21**(22): 2861-2873.

Narendra, D., Walker JE., Youle R (2012). "Mitochondrial quality control mediated by PINK1 and Parkin: links to parkinsonism". *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**(11).

Nemani, V. M., W. Lu, V. Berge, K. Nakamura, B. Onoa, M. K. Lee, F. A. Chaudhry, R. A. Nicoll and R. H. Edwards (2010). "Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis". *Neuron* **65**(1): 66-79.

Nicklas, W. J., S. K. Youngster, M. V. Kindt and R. E. Heikkila (1987). "MPTP, MPP+ and mitochondrial function". *Life Sci* **40**(8): 721-729.

Nussbaum, R. L. and C. E. Ellis (2003). "Alzheimer's disease and Parkinson's disease". *N Engl J Med* **348**(14): 1356-1364.

Omar, S. H. (2010). "Oleuropein in olive and its pharmacological effects". Sci Pharm **78**(2): 133-154.

Polymeropoulos MH1, L. C., Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. (1997). "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease". Science **276**(5321): 2045-2047.

Postuma RB, Lang AE, Munhoz RP, Charland K, Pelletier A, Moscovich M, Filla L, Zanatta D, Rios Romenets S, Altman R, Chuang R, Shah B. (2012). "Caffeine for treatment of Parkinson disease: a randomized controlled trial". Neurology **79**(7): 651-8.

Przedborski, W. D. a. S. (2003). "Parkinson's disease mechanisms and models". Neuron **39**: 889-909.

Puyal, J., V. Ginet, A. Vaslin, A. C. Truttmann and P. G. Clarke (2009). "[The two faces of autophagy in the nervous system]". Med Sci (Paris) **25**(4): 383-390.

Quik, M. (2004). "Smoking, nicotine and Parkinson's disease". Trends Neurosci **27**(9): 561-568.

Ribeiro JA, S. A. (2010). "Caffeine and Adenosine". Journal of Alzheimer's Disease **20**.

Ross, G. W., R. D. Abbott, H. Petrovitch, D. M. Morens, A. Grandinetti, K. H. Tung, C. M. Tanner, K. H. Masaki, P. L. Blanchette, J. D. Curb, J. S. Popper and L. R. White (2000). "Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease". JAMA **283**(20): 2674-2679.

Saito, Y., K. Nishio, Y. Ogawa, T. Kinumi, Y. Yoshida, Y. Masuo and E. Niki (2007). "Molecular mechanisms of 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity in PC12 cells: involvement of hydrogen peroxide-dependent and -independent action". Free Radic Biol Med **42**(5): 675-685.

Saunders-Pullman, R. (2003). "Estrogens and Parkinson disease: neuroprotective, symptomatic, neither, or both?" Endocrine **21**: 81-87.

Scott, D. A., I. Tabarean, Y. Tang, A. Cartier, E. Masliah and S. Roy (2010). "A pathologic cascade leading to synaptic dysfunction in alpha-synuclein-induced neurodegeneration". J Neurosci **30**(24): 8083-8095.

- Serra, A., L. Rubio, X. Borras, A. Macia, M. P. Romero and M. J. Motilva (2012). "Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake". Mol Nutr Food Res **56**(3): 486-496.
- Singh, N., Pillay, Viness, Choonara, Yahya E. (2007). "Advances in the treatment of Parkinson's disease". Progress in Neurobiology **81**(1): 29-44.
- Speroni E, G. M., Minghetti A, Crespi-Perellino N, Pasini P, Piazza F, Roda, A (1998). "Oleuropein evaluated in vitro and in vivo as an antioxidant". Phytotherapy Research **12**: 98-100.
- Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes and M. Goedert (1997). "Alpha-synuclein in Lewy bodies". Nature **388**(6645): 839-840.
- Stefanis, L. (2012). "Alpha-Synuclein in Parkinson's disease". Cold Spring Harb Perspect Med **2**(2): a009399.
- Tanida, I., T. Ueno and E. Kominami (2008). "LC3 and Autophagy". Methods Mol Biol **445**: 77-88.
- Twelves, D., K. S. Perkins and C. Counsell (2003). "Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease". Mov Disord **18**(1): 19-31.
- 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.
- Vanderheyden, J.-E. (2012). « Maladie de Parkinson, aperçu historique ». [http://www.parkinsonasbl.be/apercu-historique/#.VRB\\_M46G\\_JZ](http://www.parkinsonasbl.be/apercu-historique/#.VRB_M46G_JZ)
- Visioli, F., G. Bellomo and C. Galli (1998). "Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols". Biochem Biophys Res Commun **247**(1): 60-64.
- Vissers, M. N., P. L. Zock, A. J. Roodenburg, R. Leenen and M. B. Katan (2002). "Olive oil phenols are absorbed in humans". J Nutr **132**(3): 409-417.
- 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, H. L., A. H. Chou, A. S. Wu, S. Y. Chen, Y. H. Weng, Y. C. Kao, T. H. Yeh, P. J. Chu and C. S. Lu (2011). "PARK6 PINK1 mutants are defective in maintaining mitochondrial membrane potential and inhibiting ROS formation of substantia nigra dopaminergic neurons". *Biochim Biophys Acta* **1812**(6): 674-684.
- Webb, J. L., B. Ravikumar, J. Atkins, J. N. Skepper and D. C. Rubinsztein (2003). "Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome". *J Biol Chem* **278**(27): 25009-25013.
- Wolters, E. and H. Braak (2006). "Parkinson's disease: premotor clinico-pathological correlations". *J Neural Transm Suppl*(70): 309-319.
- Yelena Y. Glinka, M. B. H. Y. (1995). "Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine". *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology* **292**(3-4): 329-332.
- Zhang, F. W., S. Gan, L. Vosler, P. S. Gao, Y. Zigmond, M. J. Chen, J. (2011). "Protective effects and mechanisms of sirtuins in the nervous system". *Prog Neurobiol* **95**(3): 373-395.
- Zhang ZX, R. G. (1993). "Worldwide occurrence of Parkinson's disease: an update review". *Neuro-epidemiology* **12**: 195-208.
- Zhu, J., R. K. Dagda and C. T. Chu (2011). "Monitoring mitophagy in neuronal cell cultures". *Methods Mol Biol* **793**: 325-339.