

INRS-Institut Armand Frappier

**ÉTUDE DE DIVERS MÉCANISMES DE PROTECTION PAR DES COMPOSÉS
PHÉNOLIQUES CONTRE LA NEUROTOXICITÉ DU PEPTIDE β -AMYLOÏDE :
ANALYSE DU RÔLE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION NUCLEAIRE κ B.**

**Par
Fanny Longpré**

**Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences expérimentales de la santé.**

Jury d'évaluation

**Président du jury
et examinateur interne
Examineur externe**

Thomas Sanderson, INRS-Institut Armand Frappier

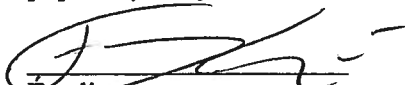
**Raphaël Anguenot,
Département de chimie-biochimie,
Université de Moncton.**

Directeur de recherche

Charles Ramassamy, INRS-Institut Armand Frappier

RÉSUMÉ

La diète méditerranéenne ainsi que certains extraits naturels pourraient être bénéfiques dans la prévention ou le traitement de la maladie d'Alzheimer. Le cerveau des patients atteints de cette maladie est caractérisé par l'accumulation du peptide β -amyloïde et l'activation du facteur de transcription nucléaire κ B (NF- κ B) a été observée sur des tissus cérébraux en *post mortem*. Lorsqu'il est activé, le NF- κ B se fixe à une séquence spécifique de l'ADN présente sur le promoteur de certains gènes (la séquence κ B) et peut entraîner la transcription de ceux-ci. Cette séquence se retrouve sur le promoteur du gène du peptide précurseur de l'amyloïde (PPA). Toxique sous sa forme fibrillaire, le peptide β -amyloïde induit un stress oxydant et l'apoptose neuronale. Nous nous sommes intéressés à l'effet de l'extrait standardisé de *Ginkgo biloba* EGb 761 et de ses sous-fractions, les flavonoïdes (CP205) et ginkgolide B (BN52021), sur la fibrillation du peptide β -amyloïde. Nous avons également étudié le potentiel et les mécanismes neuroprotecteurs du tyrosol et de l'OH-tyrosol, deux composés phénoliques de l'huile d'olive, contre la toxicité du peptide β -amyloïde. L'effet de ces antioxydants sur l'activité du NF- κ B dans la protection contre le peptide β -amyloïde ainsi que l'implication de ce facteur de transcription dans la synthèse du peptide β -amyloïde ont été étudiés. Les cellules Neuro-2a, des neuroblastes provenant de tumeurs cérébrales de souris, a été choisi comme modèle cellulaire. Par microscopie électronique, nous avons observé que les flavonoïdes (CP205), contrairement au ginkgolide B (BN52021), sont impliqués dans l'inhibition de la fibrillation du peptide β -amyloïde fragment 1-40 par EGb 761 *in vitro*. La co-incubation des cellules N2a avec le tyrosol ou l'OH-tyrosol protège de la toxicité induite par le peptide β -amyloïde fragment 25-35, ce qui a été constaté par la mesure de l'activité mitochondriale et de l'intégrité de la membrane cytoplasmique (test de survie cellulaire XTT et test de cytotoxicité basé sur l'activité de la lactate déshydrogénase, respectivement). L'OH-tyrosol protège de la toxicité du H_2O_2 , un médiateur de la toxicité du peptide β -amyloïde, suggérant que ce composé protège de la toxicité de ce peptide par un mécanisme antioxydant. La modulation du NF- κ B par ces composés phénoliques dans la protection contre la toxicité du peptide β -amyloïde a été étudiée par immunobuvardage. L'EGb 761 diminue l'activité du NF- κ B alors que l'OH-tyrosol l'augmente et que le tyrosol n'a pas d'effet. Ces résultats confirment que la régulation du NF- κ B dépend du stimulus et que l'activation autant que l'inhibition peuvent être associées à la protection des cellules neuronales contre un même agent toxique. L'implication du NF- κ B dans la synthèse du peptide β -amyloïde a été étudiée par la détection de ce peptide toxique, par ELISA, dans les structures cérébrales de souris p50 $-/-$. p50 est une sous-unité du NF- κ B qui se fixe à la séquence κ B de l'ADN. La concentration du peptide β -amyloïde fragment 1-42 est significativement plus élevée dans le cortex temporal des souris p50 $-/-$ comparativement aux souris sauvages. La concentration du peptide β -amyloïde fragment 1-40 est significativement plus élevée dans le striatum, l'hippocampe et le cortex temporal des souris p50 $-/-$ comparativement aux souris sauvages. Ces résultats suggèrent que l'activation du NF- κ B dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer serait un mécanisme compensatoire pour diminuer la synthèse et l'accumulation du peptide β -amyloïde.



Etudiant



Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, le professeur Charles Ramassamy. Également, un gros gros gros merci à Lorenza qui a passé ses journées à me supporter pour que je ne fasse pas de bulle. Pour votre support, merci à Benoit, Daniel, Louise, Nathalie et Luc! Je voudrais remercier particulièrement Simon, Étienne et Estelle qui ont été de vrais anges et qui m'ont laissé travailler à la table de la salle à manger, dans le salon, dans leur chambre, à l'îlot de la cuisine jusqu'à des heures impossibles.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
CHAPITRE 1	11
Revue de la littérature	11
1.1 La maladie d'Alzheimer.....	12
1.1.1 La réalité canadienne	12
1.1.2 Les traitements actuels.....	12
1.2 Le peptide β -amyloïde et ses mécanismes de toxicité	13
1.2.1 Description et formation du peptide β -amyloïde	13
1.2.2 La toxicité du peptide β -amyloïde	15
1.2.2.1 La forme toxique du peptide β -amyloïde.....	15
1.2.2.2 Peptide β -amyloïde et stress oxydant.....	16
1.2.2.3 Peptide β -amyloïde et apoptose	17
1.3 Le facteur de transcription nucléaire κ B et la maladie d'Alzheimer	18
1.3.1 Structure et fonctionnement général du facteur de transcription nucléaire κ B.....	19
1.3.2 La régulation du facteur de transcription nucléaire κ B par le potentiel rédox intracellulaire	22
1.3.3 Le facteur de transcription nucléaire κ B dans les neurones: médiateur pro et anti-apoptotique	23
1.3.4 Rôle du facteur de transcription nucléaire κ B dans la maladie d'Alzheimer et dans la toxicité du peptide β -amyloïde	24
1.4 L'extrait standardisé de <i>Ginkgo biloba</i> EGb 761	25
1.4.1 La composition de l'EGb 761	25
1.4.2 Efficacité de l'EGb 761 dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.....	28
1.4.2.1 Les études cliniques	28
1.4.2.2 Les études chez les animaux	28
1.4.3 Les mécanismes de protection par l'EGb 761 contre la toxicité du β A.....	29
1.4.3.1 Les effets anti-fibrillaire de l'EGb 761	29
1.4.3.2 Les effets anti-oxydants et la protection contre les radicaux libres par l'EGb 761	29
1.4.3.3 Les effets anti-apoptotiques de l'EGb 761.....	30
1.4.4 Rôle des flavonoïdes et des terpénoïdes dans la protection par l'EGb 761 contre la toxicité du peptide β -amyloïde.....	31
1.5 Le tyrosol et l'hydroxytyrosol	32
1.5.1 Le tyrosol et l'hydroxytyrosol dans la diète méditerranéenne	32
1.5.2 Le potentiel antioxydant du tyrosol et de l'hydroxytyrosol.....	33
CHAPITRE 2.....	35
Matériel et méthodes.....	35
2.1 Culture des neuroblastes murins N2a	35
2.2 Mécanismes de protection de l'EGb 761 contre la toxicité du peptide β -amyloïde et implication des flavonoïdes et du ginkgolide B.....	35
2.2.1 Fibrillation du peptide β -amyloïde et mortalité/survie cellulaire.	35
2.2.2 Modulation du facteur de transcription nucléaire κ B	37

2.3 Effet neuroprotecteur et mécanismes de protection du tyrosol et de l'hydroxytyrosol contre la toxicité du peptide β -amyloïde.....	39
2.3.1 Effet neuroprotecteur du tyrosol et de l'hydroxytyrosol.....	39
2.3.2 Détermination du potentiel antioxydant du tyrosol et de l'hydroxytyrosol.....	40
2.3.3 Détermination du potentiel anti-apoptotique du tyrosol et de l'hydroxytyrosol.....	41
2.3.4 Modulation du facteur de transcription nucléaire κ B par le tyrosol et l'hydroxytyrosol.....	42
2.3 Implication du facteur de transcription nucléaire κ B dans la synthèse du peptide β -amyloïde : détection du peptide β -amyloïde chez les souris p50 -/-.....	42
2.4 Analyse statistique	42
CHAPITRE 3	43
Résultats	43
3.1 Mécanismes de protection de l'EGb 761 contre la toxicité du peptide β -amyloïde et implication des flavonoïdes et du ginkgolide B.....	43
3.1.1 Effet de l'EGb 761 sur la fibrillation du peptide β -amyloïde et sur la mortalité/survie cellulaire.	44
3.1.2 Modulation du facteur de transcription nucléaire κ B par l'EGb 761, le BN52021 et le CP205 dans la protection contre la toxicité du β A.	50
3.2 Potentiel neuroprotecteur et mécanismes de protection du tyrosol et de l'hydroxytyrosol contre la toxicité du peptide β -amyloïde.....	61
3.2.1 Potentiel neuroprotecteur du tyrosol et de l'hydroxytyrosol	61
3.2.2 Le potentiel antioxydant du tyrosol et de l'hydroxytyrosol.....	65
3.2.3 Le potentiel anti-apoptotique du tyrosol et de l'hydroxytyrosol.....	71
3.2.4 Modulation du facteur de transcription nucléaire κ B par le tyrosol et l'hydroxytyrosol.....	74
3.3 Implication du facteur de transcription nucléaire κ B dans la synthèse du peptide β -amyloïde.....	77
CHAPITRE 4	80
Discussion	80
4.1 Mécanismes de protection de l'EGb 761 contre la toxicité du peptide β -amyloïde et implication des flavonoïdes et du ginkgolide B.....	80
4.1.1 L'EGb 761 et les flavonoïdes: inhibition de la fibrillation du peptide β -amyloïde.....	80
4.1.2 Modulation du NF- κ B : inhibition par l'EGb 761, activation par les flavonoïdes et le ginkgolide B	82
4.2 Potentiel neuroprotecteur et mécanismes de protection du tyrosol et de l'hydroxytyrosol contre la toxicité du peptide β -amyloïde.....	85
4.2.1 Le tyrosol et l'hydroxytyrosol : protection des cellules N2a contre la toxicité du peptide β -amyloïde.....	85
4.2.2 Effet antioxydant : hydroxytyrosol, tyrosol et protection contre la toxicité du H_2O_2	86
4.2.3. Le potentiel anti-apoptotique du tyrosol et de l'hydroxytyrosol	87
4.2.4. Modulation du NF- κ B : activation par l'hydroxytyrosol	88
4.3 Implication du facteur de transcription nucléaire κ B dans la synthèse du peptide β -amyloïde.....	88
4.4 Les techniques utilisées.....	89

4.4.1 Toxicologie <i>in vitro</i> : LDH et XTT.....	89
4.4.2 Immunobuvardage et activation du NF- κ B.....	91
4.4.3 Détection de l'apoptose : annexin V	91
CONCLUSION.....	93
PERSPECTIVES	95
LISTE DES RÉFÉRENCES	96

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. La voie des sécrétases dans la synthèse du βA	14
Figure 2. Fonctionnement général du NF- κB	21
Figure 3. Quelques constituants importants de l'EGb 761.	27
Figure 4. Le tyrosol (A) et l'OH-tyrosol (B).	33
Figure 5. Observation par microscopie électronique du βA_{1-40} suivant le processus de vieillissement <i>in vitro</i>	45
Figure 6. Effet de la co-incubation du βA_{1-40} avec l'EGb 761, le CP205, ou le BN52021 lors du processus de vieillissement sur la mortalité des cellules N2a.....	46
Figure 7. Effet de la co-incubation du βA_{1-40} avec l'EGb 761, le CP205 ou le BN52021 lors du processus de vieillissement sur la survie des cellules N2a.	47
Figure 8. Effet de la co-incubation du βA_{25-35} avec l'EGb 761, le CP205 ou le BN52021 lors du processus de vieillissement sur la mortalité des cellules N2a.....	49
Figure 9. Effet de la co-incubation du βA_{25-35} avec l'EGb 761, le CP205 ou le BN52021 lors du processus de vieillissement sur la survie des cellules N2a.	50
Figure 10. Contrôle de la séparation des protéines cytoplasmiques et nucléaires.	51
Figure 11. Effet-dose de l'EGb 761 sur l'activité du NF- κB (fraction cytoplasmique). ...	53
Figure 12. Effet-dose de l'EGb 761 sur l'activité du NF- κB (fraction nucléaire).	54
Figure 13. Effet inhibiteur de l'EGb 761 sur l'activation du NF- κB induite par la cycloheximide (fraction nucléaire).	56
Figure 14. Modulation du NF- κB par le CP205 et le BN52021.	58
Figure 15. Effet-dose du βA_{25-35} sur la survie des cellules N2a.	59
Figure 16. Modulation du NF- κB par l'EGb 761 et/ou βA_{25-35}	60
Figure 17. Protection des cellules N2a par le tyrosol contre la toxicité du βA_{25-35} (test de mortalité LDH).....	62
Figure 18. Protection des cellules N2a par le tyrosol contre la toxicité du βA_{25-35} (test de survie XTT).....	63
Figure 19. Protection des cellules N2a par l'OH-tyrosol contre la toxicité du βA_{25-35} (test de mortalité LDH).	64
Figure 20. Protection des cellules N2a par l'OH-tyrosol contre la toxicité du βA_{25-35} (test de survie XTT).	65
Figure 21. Effet-dose du H_2O_2 sur la survie des cellules N2a.	66
Figure 22. Effet de l'OH-tyrosol sur la toxicité du H_2O_2 chez les cellules N2a (test de mortalité LDH).....	67
Figure 23. Effet de l'OH-tyrosol sur la toxicité du H_2O_2 chez les cellules N2a (test de survie XTT).	68
Figure 24. Effet de l'OH-tyrosol sur la toxicité du H_2O_2 chez les cellules N2a (microscopie).	69
Figure 25. Effet du tyrosol sur la toxicité du H_2O_2 chez les cellules N2a (test de survie XTT).	70
Figure 26. Effet du tyrosol sur la toxicité du H_2O_2 chez les cellules N2a (microscopie). ..	71
Figure 27. Effet du tyrosol sur l'apoptose des cellules N2a induite par le βA_{25-35}	74
Figure 28. Modulation du NF- κB par le tyrosol et/ou βA_{25-35}	75
Figure 29. Modulation du NF- κB par l'OH-tyrosol et/ou βA_{25-35}	77
Figure 30. Quantité de βA_{1-40} dans les structures cérébrales de souris déficientes en la sous-unité p50 du NF- κB (p50 -/-).....	78

Figure 31. Quantité de βA_{1-42} dans les structures cérébrales de souris déficientes en la sous-unité p50 du NF- κ B (p50 -/-).....	79
--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4-HNE	4-Hydroxynonénal
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholine estérase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	Analysis of variance
ApoE	Apolipoprotéine E
βA	Peptide β -amyloïde
BCA	Bicinchoninic Acid
CO₂	Dioxyde de carbone
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffer Saline
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FBS	Fœtal Bovine Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
HDAC 1	Histone Désacétylase 1
HCl	Acide Chlorhydrique
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
H₂O_d	Eau distillée
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukine
INT	Chlorure de 2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium
LDH	Lactate déshydrogénase
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharides
LPSG	Lait en Poudre Sans Gras
Lys	Lysine
MA	Maladie d'Alzheimer
SOD	Super Oxyde Dismutase
NF-κB	Nuclear Factor κ B
NGF	Nerve Growth Factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
O₂⁻	Anion superoxyde
OH[•]	Radical hydroxyl
OH-tyrosol/OH-tyr	Hydroxytyrosol
PBS	Phosphate Buffer Saline
PMS	Phenazine methosulfate
PPA	Protéine précurseur de l'amyloïde
PS1 ou 2	Préséniline 1 ou 2
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RHD	Rel Homology Domain
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

Ser	Sérine
SNC	Système nerveux central
TBST	Tris Buffer Saline-Tween
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
TP	Température Pièce
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
Tyr	Tyrosol
XTT	Sel de 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide

CHAPITRE 1

Revue de la littérature

Depuis le début du 20^{ième} siècle, nous assistons au vieillissement de la population ce qui entraîne une hausse des cas de démence. En effet, le vieillissement est en soit un facteur de risque majeur pour toutes les formes de démence, particulièrement la maladie d'Alzheimer (MA). Cette maladie est caractérisée par une perte progressive et irréversible des neurones du cerveau, particulièrement dans le cortex cérébral et l'hippocampe qui sont des régions importantes pour la mémoire et les processus d'apprentissage. Dans ces régions, il y a accumulation du peptide β -amyloïde (β A), toxique sous sa forme fibrillaire, qui entraîne un stress oxydant et l'apoptose neuronale. De plus, l'activation du facteur de transcription nucléaire κ B (NF- κ B) a été observée dans le cerveau des patients atteints de la MA. Le rôle du NF- κ B dans cette maladie neurodégénérative n'est pas bien compris.

Il n'y a aucun traitement préventif ou curatif pour la MA, les traitements actuels étant uniquement symptomatiques. Certaines avenues de traitement permettant de prévenir l'apparition de la MA ou de ralentir sa progression sont intéressantes et prometteuses. Les études cliniques suggèrent que l'extrait standardisé de *Ginkgo biloba* EGb 761 pourrait avoir des effets bénéfiques chez les patients atteints de la MA. Certains effets protecteurs par EGb 761 contre la toxicité du β A ont été identifiés : effets anti-fibrillaire, anti-oxydant et anti-apoptotique. Par contre, beaucoup de chemin reste à faire pour comprendre les mécanismes d'actions cellulaires et moléculaires de cet extrait et de ses composantes.

La diète méditerranéenne pourrait aussi être associée à un effet préventif sur les déclin cognitif liés à l'âge, notamment la MA. Les composantes de cette diète responsables de l'effet protecteur n'ont pas été identifiées. L'huile d'olive contient des molécules anti-oxydantes comme le tyrosol et l'hydroxytyrosol (OH-tyrosol) qui pourraient participer à l'effet préventif de cette diète et protéger contre la toxicité du β A.

1.1 La maladie d'Alzheimer

1.1.1 La réalité canadienne

Depuis le début du 20^{ième} siècle, le pourcentage de personnes âgées dans la population augmente de façon constante. Parallèlement à l'augmentation de l'espérance de vie et au vieillissement de la population, de plus en plus de personnes souffrent de démence. Il y a environ 60 000 nouveaux cas de démence par année au Canada (Canadian Study of Health and Aging Working Group, 2000). Le type le plus commun de démence est la MA, représentant 64 % des cas de démence affectant 5,1 % des canadiens de plus de 65 ans et 26 % de ceux ayant plus de 85 ans (Canadian Study of Health and Aging Working Group, 1994). Toujours au Canada, le coût annuel sociétal des soins aux personnes atteintes de la MA est de 9 451 dollars canadiens pour les cas légers à plus de 36 794 dollars canadiens pour les cas sévères. L'institutionnalisation constitue l'élément le plus important des coûts (Hux *et al.*, 1998).

1.1.2 Les traitements actuels

Les cellules du cortex cérébral et de l'hippocampe sont les plus touchées dans la MA. Celles-ci produisant l'acétylcholine (ACh), certains progrès ont été fait en utilisant des inhibiteurs de l'acétylcholine estérase (AChE), l'enzyme responsable de la dégradation de l'ACh dans la fente synaptique. Ces drogues permettent d'augmenter la concentration de l'ACh dans le cerveau en inhibant sa dégradation (Ellis, 2005). Cependant, leur efficacité diminue au fur et à mesure que la maladie progresse car il y a de moins en moins de cellules capables de produire l'ACh. Des drogues inhibitrices de l'AChE telles l'Aricept (Donépézil, E2020) et l'Exelon sont actuellement utilisées pour le traitement symptomatique de la MA mais ils sont peu efficaces (Birks, 2006). Il n'y a aucun traitement curatif ou préventif de la MA. Le $\beta\Lambda$, grand responsable de la mort neuronale observée dans cette maladie, est une cible intéressante pour le traitement de la MA.

1.2 Le peptide β -amyloïde et ses mécanismes de toxicité

1.2.1 Description et formation du peptide β -amyloïde

Le β A est un peptide qui se retrouve à des concentrations minimales, moins de 7 pmol/g de tissus cérébral, chez les personnes âgées non atteintes de la MA alors que chez les patients atteints, la quantité de β A est de 500 à 4 000 fois plus élevée (Gravina *et al.*, 1995). La concentration de β A est probablement plus élevée localement puisque celui-ci s'aggrège pour former des plaques. Ce peptide impliqué dans la pathogenèse de la MA contient de 39 à 43 acides aminés (Glennner et Wong, 1984) et provient d'une glycoprotéine trans-membranaire appelée protéine précurseur de l'amyloïde (PPA). Cette protéine est codée par un gène du chromosome 21 (Blacker et Tanzi, 1998). La PPA est la cible de plusieurs protéases différentes appelées sécrétases (**figure 1**). La β -sécrétase génère l'extrémité N-terminal du β A en clivant la PPA pour produire une version soluble de celle-ci (β -PPA_s) et un fragment de 99 acides aminés (C99) qui demeure lié à la membrane. L' α -sécrétase coupe dans la région du β A pour produire l' α -PPA_s et un fragment de 83 acides aminés (C83). C99 et C83 sont tout deux des substrats de la γ -sécrétase qui protéolyse au centre du domaine trans-membranaire pour produire le β A à partir de C99 et le peptide p3 à partir du C83. La protéolyse par la γ -sécrétase est hétérogène et produit généralement un peptide de 40 ou 42 acides aminés. Une étude sur des tissus en *post mortem* a démontré qu'il y a plus de β A₁₋₄₂ produit que de β A₁₋₄₀ (Beffert *et al.*, 1999), autant chez les sujets sans démences que chez les sujets ayant eux la MA.

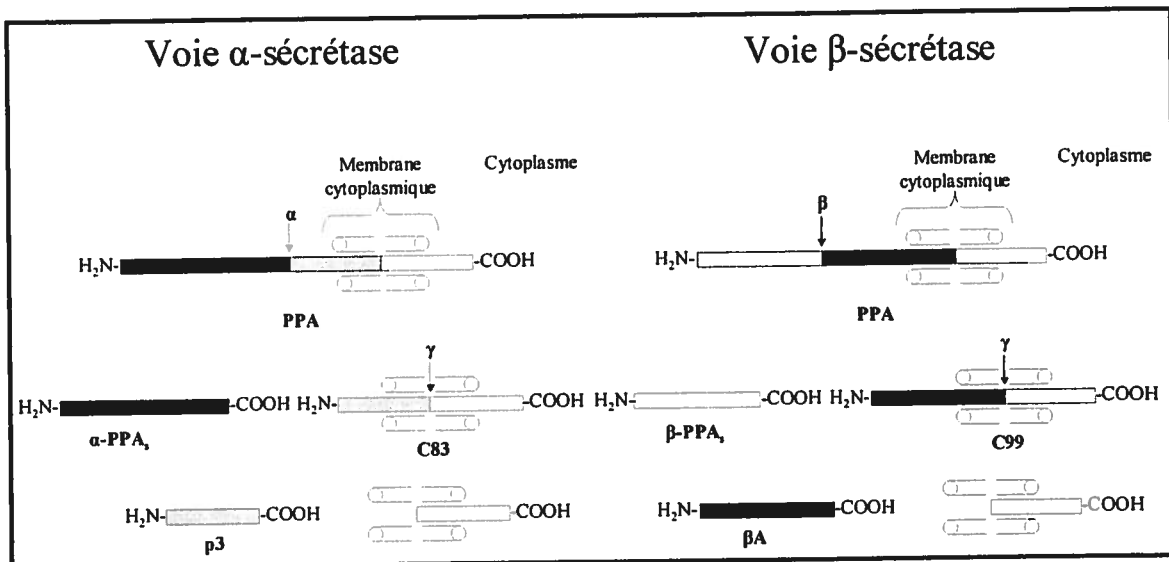


Figure 1. La voie des sécrétases dans la synthèse du β A.

Chez les patients atteints de la MA, le β A se dépose et forme des plaques appelées plaques séniles. Ces plaques sont des masses de fins (5-10 nm de diamètre) filaments (fibrilles) formées dans l'espace extracellulaire de certaines régions du cerveau des patients atteints de la MA (Merz *et al.*, 1983; Narang, 1980; Vickers *et al.*, 2000). Ces fibrilles ont été isolées des plaques séniles (Roher *et al.*, 1986) et sont constituées d'agrégats de β A₁₋₄₀/ β A₁₋₄₂ mais majoritairement de β A₁₋₄₂ (Gravina *et al.*, 1995; Roher *et al.*, 1993; Iwatsubo *et al.*, 1994). Les plaques sont majoritairement constituées du β A₁₋₄₂ parce qu'il y en a plus de produit (Beffert *et al.*, 1999) et qu'il est beaucoup moins soluble (Jarret, Berger et Lansbury, 1993) que le β A₁₋₄₀. Les plaques séniles sont concentrées dans les régions où il y a une mort neuronale importante, particulièrement au niveau de l'hippocampe (Hyman *et al.*, 1984; Hyman, Van Hoesen et Damasio, 1990) et du cortex cérébral (Braak et Braak, 1991).

Plusieurs découvertes et observations sur la toxicité du β A soutiennent la théorie selon laquelle l'accumulation et le dépôt du β A dans le cerveau pendant plusieurs décennies entraînent une mortalité neuronale et mènent éventuellement à la manifestation clinique de la MA. D'abord, certaines mutations au niveau de la PPA favorisant la voie de la β -sécrétase et la formation de β A causent une forme familiale autosomique dominante de la MA (Chartier-Harlin *et al.*, 1991; Goate *et al.*, 1991; Murrell *et al.*, 1991). Notons que les formes familiales de cette maladie, impliquant des mutations au niveau des gènes

de la PPA, des présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2), représentent seulement 10 % des cas de MA (Campion *et al.*, 1999). Tout comme chez les patients atteints de la MA, le cerveau des personnes atteintes du syndrome de Down (Trisomie 21) est caractérisé par l'accumulation de β A. En effet, ces personnes possèdent une copie supplémentaire du gène PPA puisque celui-ci se retrouve sur le chromosome 21 (Goldgaber *et al.*, 1987; Kang *et al.*, 1987; Tanzi *et al.*, 1987). Elles produisent plus de β A à partir de la naissance, des plaques d'amyloïde apparaissent lorsqu'ils sont relativement jeunes (20-30 ans) (Mann *et al.*, 1989). Finalement, la progression de vieillissement « physiologique » à vieillissement « pathologique » jusqu'au développement de la MA se traduit par une augmentation conséquente du β A insoluble dans le cerveau des patients (Wang *et al.*, 1999).

1.2.2 La toxicité du peptide β -amyloïde

Par des études *in vitro* (Lambert *et al.*, 1998; Lorenzo et Yankner, 1994; Pike *et al.*, 1991, 1993;) et *in vivo* (Geula *et al.*, 1998; Kowall *et al.*, 1992; McKee *et al.*, 1998; Weldon *et al.*, 1998), il a été démontré que le β A cause la mort neuronale. Le β A est toxique sous sa forme fibrillaire et nous nous intéresserons ici à deux de ses mécanismes de toxicité : l'induction d'un stress oxydant et de l'apoptose neuronale.

1.2.2.1 La forme toxique du peptide β -amyloïde

L'activité neurotoxique du β A dépend de sa conformation et de son état d'agrégation. Kirschner *et al.* (1986) ont démontré que les fibrilles constituant les plaques séniles sont composées de β A ayant une conformation en feuillet β . En fait, la conformation en feuillet β est nécessaire pour la formation de fibrilles et l'activité neurotoxique du β A. L'incubation de β A synthétique faiblement ou non toxique dans une solution aqueuse pour plusieurs jours avant son utilisation (vieillessement) provoque un changement de conformation de boucle aléatoire à feuillet β et augmente la toxicité du β A (Pike *et al.*, 1991; Simmons *et al.*, 1994). L'importance de la conformation en feuillet β dans la toxicité du β A a été démontrée par l'utilisation d'Ia β 5, un peptide court partiellement homologue du β A contenant des résidus qui bloquent la formation de

feuillets β . En inhibant l'adoption de la conformation en feuillet β , ce peptide prévient la toxicité du $A\beta_{1-42}$ (50 μ M, 2 jours) sur les neuroblastes humains IMR-32 en culture, réduit le dépôt de $A\beta$ *in vivo* et bloque complètement la formation de fibrilles d'amyloïde dans le cerveau de rats modélisant une amyloïdose (Soto *et al.*, 1998).

Ward *et al.* (2000) ont montré, sur les cellules gliales de rat B12 et les cellules d'hippocampe de rats en culture primaire, que le β A sous forme fibrillaire est toxique alors que les monomères ne le sont pas. D'ailleurs, l'inhibition de la formation des fibrilles de $\beta A_{1-40}/\beta A_{1-42}$ (20 μ M) avec le rouge Congo inhibe la toxicité induite sur les cellules d'hippocampe de rats en culture primaire (Lorenzo et Yankner, 1994). Avec le même modèle cellulaire, Pike *et al.* (1993) ont démontré que la réduction de l'agrégation du β A fragment 25-35 (βA_{25-35}) et βA_{1-42} par certains solvants est accompagnée d'une réduction de la mort cellulaire.

1.2.2.2 Peptide β -amyloïde et stress oxydant

Les espèces réactives oxygénées (ROS pour « reactive oxygen species ») sont impliquées dans le développement et la progression de la MA. Les études effectuées sur des tissus de cerveau en *post-mortem* provenant de patients ayant eu la MA ont révélé la présence de marqueurs de la peroxydation des lipides notamment dans le cortex frontal (Pratico *et al.*, 2004; Ramassamy *et al.*, 1999; Subbarao *et al.*, 1990), le cortex temporal (Palmer et Burns, 1994; Pratico *et al.*, 2004) et dans l'hippocampe (Dei *et al.*, 2002; Lovell *et al.*, 1995; Ramassamy *et al.*, 2000). Certaines études ont aussi démontré dans l'hippocampe la présence de protéines oxydées (Hensley *et al.*, 1995), l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes (Mn-SOD, glutathion transférase, glutathion réductase et catalase) (Lovell *et al.*, 1995) et l'oxydation d'acides nucléiques (Nunomura *et al.*, 2004; Shan, Tashiro et Glenn Lin, 2003).

Le β A est en grande partie responsable du stress oxydant observé dans la MA. D'abord, la présence de macromolécules oxydées et l'activation d'enzymes antioxydantes ont été constatées principalement dans les zones du cerveau où il y a accumulation importante de plaques séniles, soit l'hippocampe et le cortex, tel que mentionné dans le

paragraphe précédent. Ensuite, les études *in vitro* ont montré que les β A peuvent eux-mêmes générer des ROS. Lorsque le β A₁₋₄₀ et le β A₂₅₋₃₅ sont incubés dans une solution aqueuse en absence de cellule, ils génèrent des ROS, le β A₂₅₋₃₅ beaucoup plus rapidement que β A₁₋₄₀ (Butterfield *et al.*, 1994; Hensley *et al.*, 1994). Dans les cellules neuronales en culture primaire, l'addition de β A mène à la production rapide de H₂O₂, à l'augmentation des ROS intracellulaires, à la peroxydation des lipides et à la mort neuronale, démontrant ainsi que les dommages par des radicaux libres ont un rôle à jouer dans sa toxicité (Behl *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1995). Dans les neuroblastes murins N2a swe/ Δ 9, une lignée cellulaire de N2a exprimant de façon stable la mutation suédoise APP695 et la délétion de l'exon 9 du gène de la PS1 (mutations qui augmentent la production totale et l'accumulation intracellulaire de β A), une élévation du niveau de H₂O₂ est observée (Smith et Luo, 2003). Chez les souris transgéniques Tg2576 modélisant l'accumulation du β A dans la MA, il y a augmentation de la peroxydation lipidique comparativement aux souris sauvages (Pratico *et al.*, 2001). Toutes ces études démontrent que le β A entraîne la production de ROS et de H₂O₂, participant ainsi au stress oxydant observé dans la MA.

1.2.2.3 Peptide β -amyloïde et apoptose

L'analyse *post-mortem* de tissus cérébraux a révélé la présence d'apoptose dans le cerveau des patients atteints de la MA, particulièrement au niveau de l'hippocampe (Smale *et al.*, 1995). La caspase 3 est une protéase à cystéine qui intervient dans l'apoptose initiée par les mitochondries et certaines études ont démontré que celle-ci est sur-exprimée dans l'hippocampe (Gervais *et al.*, 1999) et le lobe frontal (Shimohama *et al.*, 1999) de patients ayant la MA comparativement à des sujets contrôles du même âge n'ayant pas de démence. Également, la présence importante de la caspase 3 activée a été détectée au niveau du lobe temporal (Stadelmann *et al.*, 1999), de l'hippocampe (Stadelmann *et al.*, 1999; Su *et al.*, 2001), du cortex entorhinal (Stadelmann *et al.*, 1999) et du cortex frontal (Su *et al.*, 2001) chez les patients ayant la MA.

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* confirment que le β A est responsable de l'apoptose observée dans la MA. Dans les neurones corticaux de souris en culture primaire, le β A₂₅₋₃₅ et le β A₁₋₄₂ entraînent la condensation de la chromatine, la

fragmentation de l'ADN (Loo *et al.*, 1993) et le clivage du substrat fluorogénique Ac-DEVD-MCA par la caspase 3 (Harada et Sugimoto, 1999). L'augmentation de l'activité de la caspase 3 a également été observée dans les neurones du cervelet de rat en culture primaire traités avec le βA_{25-35} (Marin *et al.*, 2000). Xu *et al.* (2001) ont démontré que le βA_{25-35} et le βA_{1-40} induisent également la fragmentation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) dans les oligodendrocytes. Tamagno *et al.* (2003) ont constaté que le βA_{1-40} et le βA_{1-42} augmentent le niveau de l'isoforme actif de la caspase 3 dans les neuroblastes humains SK-N-BE différenciés à l'acide rétinoïque en neurones dopaminergiques. L'activation de la caspase 3 est aussi observée dans les cellules N2a swe/ $\Delta 9$ caractérisées par l'augmentation de la production totale de βA (Luo *et al.*, 2002).

Nous venons de voir que la formation de fibrille par le βA est nécessaire pour son activité neurotoxique qui se traduit par l'induction d'un stress oxydant et de l'apoptose neuronale. Hors, le NF- κB , un facteur de transcription nucléaire, est régulé par le potentiel rédox intracellulaire, contrôle la transcription de nombreux gènes dont ceux codant pour des protéines pro et anti-apoptotiques et est activé dans le cerveau des patients atteints de la MA. Nous nous sommes donc intéressés au NF- κB et à son rôle dans la MA et dans la toxicité du βA .

1.3 Le facteur de transcription nucléaire κB et la maladie d'Alzheimer

Le NF- κB a été identifié pour la première fois en 1986 par Sen et Baltimore chez les lymphocytes B où il stimule la transcription de la chaîne kappa (κ) des immunoglobulines (Sen et Baltimore, 1986). Sa présence a ensuite été observée dans plusieurs types cellulaires y compris les cellules cérébrales. Depuis sa découverte, son implication et son rôle ne cessent de s'élargir. Le NF- κB joue un rôle important dans la réponse adaptative face à diverses agressions pathogéniques (bactériennes, inflammatoires, oxydatives...) et il est impliqué dans plusieurs maladies chroniques, notamment dans la MA.

1.3.1 Structure et fonctionnement général du facteur de transcription nucléaire κ B

NF- κ B est un homo- ou hétérodimère de protéines appartenant à la famille NF- κ B/Rel, laquelle contient cinq sous-unités identifiées dans les cellules de mammifère: RelA ou p65, RelB, c-rel, p50 et p52. L'hétérodimère p50/p65 est le plus abondant. Dans les cellules non stimulées, les protéines du NF- κ B restent dans le cytoplasme, liées à une protéine inhibitrice I κ B (I κ B α , β , ϵ , γ ou Bcl-3).

La sous-unité p50 dérive de la région N-terminale de son précurseur p105 et I κ B est dérivé de la partie C-terminale de p100, également précurseur de p52. Les polypeptides de la famille Rel/NF- κ B contiennent une longue séquence homologue de 300 acides aminés ou « Rel Homology Domain» (RHD). Ce domaine est responsable de la dimérisation, de la liaison à la protéine inhibitrice I κ B, de la localisation nucléaire et de la liaison à l'ADN (Ghosh, May et Kopp, 1998). Les protéines I κ B possèdent une séquence répétée ankyrine de 30-35 acides aminés, séquence ayant une affinité pour la séquence RHD des Rel. Cette affinité permet de maintenir NF- κ B dans le cytoplasme sous sa forme inactive (**figure 2**).

L'activité basale du NF- κ B, observée dans un type cellulaire donné n'ayant reçu aucun stimulus, est appelée « activité constitutive». Cette activité peut être augmentée par certains stimuli (activité inductible). De nombreux stimuli activent le NF- κ B dont plusieurs cytokines inflammatoires tel le «Tumor Necrosis Factor α » (TNF α) (Osborn *et al.*, 1989), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Schreck *et al.*, 1991), le β A (Belh *et al.*, 1994), le facteur de croissance neuronale (NGF pour «nerve growth factor») (Carter *et al.*, 1996; Wood, 1995) et la cycloheximide (Sen et Baltimore, 1986). La phosphorylation et l'ubiquitination de I κ B sont nécessaires pour sa dégradation et l'activation du NF- κ B. I κ B est phosphorylé par un complexe de protéines kinases (I κ B kinase, IKK) qui est constitué de deux sous-unités catalytiques (IKK α et IKK β) (Mercurio *et al.*, 1997; Zandi, Chen et Karin, 1997) et d'une sous-unité régulatrice (IKK γ) (Rothwarf *et al.*, 1998; Yamaoka *et al.*, 1998). IKK phosphoryle I κ B α au niveau des sérines (Ser) 32 et 36 et la phosphorylation de ces deux résidus est nécessaire pour l'activation du NF- κ B (DiDonato *et al.*, 1997; Régnier *et al.*, 1997). Dans le cas d'I κ B β , la phosphorylation a lieu au niveau

de résidus Ser en position 19 et 23 (Woronicz *et al.*, 1997). La phosphorylation de l'I κ B entraîne son ubiquitination au niveau des lysines (Lys) en position 21 et 22. Il est alors dégradé par le protéasome 26S (Thanos et Maniatis, 1995). Plusieurs études ont démontré que la dégradation de l'I κ B a lieu après sa phosphorylation mais avant sa dissociation (Beg *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1995; DiDonato, Mercurio et Karin, 1995; Traenckner, Wilk et Baeuerle, 1994).

La dégradation de I κ B libère le site de localisation nucléaire et permet aux sous-unités p50 et p65 de transiter vers le noyau. Le complexe se lie ensuite au promoteur de certains gènes ayant la séquence régulatrice κ B 5'-GGGPuNNPyPyCC-3' (séquence κ B, Pu=purine, Py=pyrimidine, N=une base, peu importe laquelle). Celle-ci est présente sur le promoteur de nombreux gènes : plusieurs cytokines dont TNF α (Collart, Baeuerle et Vassalli, 1990; Shakhov *et al.*, 1990) et l'interleukine (IL)-6 (Libermann et Baltimore, 1990; Shimizu *et al.*, 1990), certaines molécules d'adhésion tel que l'«intracellular adhesion molecule» (ICAM)-1 (van de Stolpe *et al.*, 1994) et la superoxyde dismutase-manganèse (MnSOD), une enzyme antioxydante (Das, Lewis-Molock et White, 1995). Cette séquence est aussi présente sur le promoteur de nombreux gènes anti-apoptotiques : Bfl-1/A1 (Grumont, Rourke et Gerondakis, 1999; Zong *et al.*, 1999), Bcl-xL (Chen *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999), Nr13 (Lee *et al.*, 1999) et les inhibiteurs d'apoptose (IAPs pour «inhibitors of apoptosis») (Stehlik *et al.*, 1998; You *et al.*, 1997). Le gène I κ B α est aussi induit par NF- κ B et donc génère une voie de rétroaction négative pour supprimer une activation prolongée du NF- κ B (Haskill *et al.*, 1991; Le Bail, Schmidt-Ullrich et Israël, 1993). L'expression d'I κ B β est aussi régulée par NF- κ B (Suyang *et al.*, 1996). La séquence - κ B se retrouve également sur le promoteur du gène de la protéine p105, le précurseur de p50.

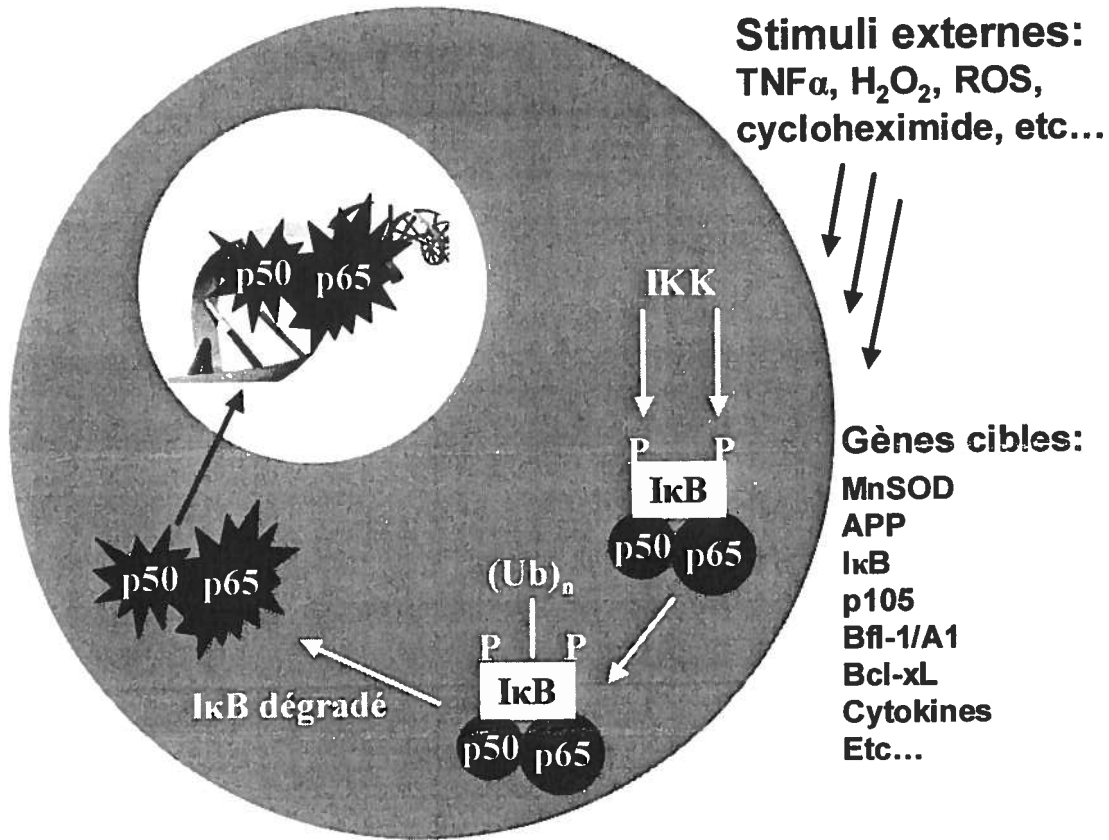


Figure 2. Fonctionnement général du NF-κB.

La sous-unité p65 semble indispensable pour le fonctionnement du NF-κB car sa déficience est létale. En effet, les souris déficientes pour la sous-unité p65 meurent au stade embryonnaire à la suite d'un important processus d'apoptose dans le foie (Beg *et al.*, 1995). Ces données suggèrent que lors du développement, NF-κB participe à la régulation de l'apoptose en exerçant un effet anti-apoptotique. Puisque p50 est une composante de la plupart des complexes NF-κB, il a été anticipé que son absence serait létale. Hors, la déficience en p50 (chez les souris p50 $^{-/-}$) ne semble pas empêcher le développement de l'animal. Cependant, il y a diminution de la réponse lymphocytaire en présence de stimuli comme les lipopolysaccharides (LPS) (un activateur du NF-κB) ou d'agents infectieux (Sha *et al.*, 1995; Snapper *et al.*, 1996). Les lymphocytes B isolés de souris p50 $^{-/-}$ ne se différencient pas en réponse aux LPS et il y a absence de l'activation du NF-κB (Sha *et al.*, 1995). Il a été démontré, dans les cellules de l'hippocampe, que la présence de p50 est nécessaire à la fixation du NF-κB à la séquence κB (Yu *et al.*, 1999). Dans les cellules neuronales, les sites κB présents sur le promoteur du gène du PPA

intéragissent de façon préférentielle avec les membres de la famille NF- κ B contenant le peptide p50, particulièrement l'homodimère p50/p50 et les hétérodimères p50/p65 et p50/c-rel (Grilli *et al.*, 1995; Grilli *et al.*, 1996). La souris déficiente en p50 (p50 $-/-$) est donc un modèle intéressant pour étudier le rôle du NF- κ B dans la transcription du gène du PPA et l'expression du PPA et du β A.

La cinétique d'activation du NF- κ B est généralement très rapide mais peut varier en fonction du type cellulaire et du stimulus. Par exemple, dans les cellules mammaires T47D, les cellules monocytiques U937 ou les Jurkat (lymphocytes T, leucémie), I κ B α est dégradé après 5 minutes de traitement avec le TNF α ou après 30 minutes de traitement avec H₂O₂ (Brown *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 1995). Dans les neurones, l'activation peut être observée très rapidement également, dès la 10^{ème} minute (Kovacs *et al.*, 2004). Par contre, le traitement des astrocytes et des neuroblastes murins N2a avec TNF α entraîne l'activation du NF- κ B seulement après 30 minutes (Kemler et Fontana, 1999). La cinétique d'activation du NF- κ B doit donc être considérée selon le type cellulaire étudié. Les neuroblastes murins N2a est un modèle cellulaire intéressant pour l'étude du rôle du NF- κ B dans la MA. D'abord, il s'agit de cellules neuronales qui produit l'AChE (Kojima *et al.*, 1994), ce qui est très intéressant puisque les cellules les plus touchées dans la MA sont les neurones cholinergiques. Ensuite, puisqu'il s'agit d'une lignée cellulaire, la culture de ces cellules est beaucoup plus simple que la culture primaire de neurones. Finalement, la cinétique d'activation du NF- κ B sur les cellules N2a par divers composés dont le TNF α (Kemler et Fontana, 1999) est connue.

1.3.2 La régulation du facteur de transcription nucléaire κ B par le potentiel rédox intracellulaire

L'implication du NF- κ B dans la réponse oxydative est maintenant indiscutable. Son activité est très sensible au potentiel rédox intracellulaire. La présence de radicaux libres et de H₂O₂ dans le cytoplasme des cellules active NF- κ B (Behl *et al.*, 1994). Son activation entraîne la transcription de gènes codant pour des antioxydants comme la Mn-SOD (Das, Lewis-Molock et White, 1995). En présence d'une variation du potentiel

rédox intracellulaire, le NF- κ B serait activé afin de protéger les cellules des lésions oxydatives.

Plusieurs études ont démontré que les antioxydants comme l' α -tocophérol (vitamine E) (Post, Holsboer et Behl, 1998; Suzuki et Packer, 1993), le resvératrol (Jang et Surh, 2003) et la quercétine (Moreira *et al.*, 2004) réduisent l'activité du NF- κ B induite par un stress oxydant. À l'opposé, certaines études ont observé que la quercétine et le resvératrol n'ont pas d'effet inhibiteur sur l'activation du NF- κ B par le H₂O₂ et pourraient même augmenter cette activation (Wadsworth et Koop, 1999). L' α -tocophérol (naturel et synthétique) (Behl, 2000) et l'«insulin-like growth factor» (IGF)-1 (Heck *et al.*, 1999) augmentent l'activité constitutive du NF- κ B, ce qui suggère que ces molécules ont, en plus de leur effet antioxydant, un effet sur la transcription de certains gènes. Par contre, dans les macrophages RAW 264.7, la quercétine augmente la liaison de p50/p65 à l'ADN sans toutefois augmenter la transcription de gènes et l'expression de protéines régulées par le NF- κ B comme le TNF- α et l'oxyde nitrique synthase inducible (iNOS pour «inducible nitric oxide synthase») (Wadsworth et Koop, 1999).

1.3.3 Le facteur de transcription nucléaire κ B dans les neurones: médiateur pro et anti-apoptotique

Les multiples données relevées dans la littérature démontrent qu'en fonction du stimulus, le NF- κ B peut être impliqué dans les mécanismes pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. En effet, le traitement de neurones en culture par un peptide bloquant le site κ B (faux peptide κ B) (Mattson *et al.*, 1997), l'inhibiteur de l'activation du NF- κ B SN50 (Maggiwar *et al.*, 1998) ou des inhibiteurs du protéasome (qui empêchent la dégradation d'I κ B) entraîne l'apoptose (Taglialatela *et al.*, 1997). L'activation du NF- κ B est nécessaire dans l'effet anti-apoptotique de Bcl-2 (Ivanov *et al.*, 1995). À l'opposé, sur ces mêmes types de cellules (les PC12 par exemple), l'activation du NF- κ B est essentielle pour l'apoptose induite par des concentrations élevées de dopamine (0,1-0,5 mM) (Panet *et al.*, 2001) ou par le 4-hydroxynonéal (4-HNE), un produit dérivé de l'oxydation des lipides (Kruman *et al.*, 1997). Les cellules PC12 sont des cellules provenant de tumeurs des glandes surrénales de rat qui ont la capacité de se différencier en neurones

dopaminergiques en présence de NGF (Greene et Tischler, 1976). De même, sur des neurones du cervelet, son activation induite par le glutamate provoque l'apoptose (Grilli *et al.*, 1996). L'effet anti- ou pro-apoptotique du NF- κ B a aussi été constaté *in vivo*. L'administration du faux peptide κ B à des souris par infusion intraventriculaire avant l'administration de kainate, un agoniste du glutamate, entraîne une augmentation de la mort neuronale dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe. Cette augmentation de la toxicité du kainate est également observée chez les souris déficientes en sous-unité p50 du NF- κ B (Yu *et al.*, 1999). Au contraire, une infusion intrastriatale d'excitotoxine, comme l'acide quinolinique (agoniste des récepteurs N-méthyl-D-aspartate, NMDA) ou l'acide kainique, entraînent l'activation du NF- κ B laquelle exerce cette fois un effet pro-apoptotique (Nakai *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 1999). L'orientation pro- ou anti apoptotique à la suite de l'activation de NF- κ B, *in vitro* ou *in vivo*, dépendrait donc du stimulus et de son intensité.

1.3.4 Rôle du facteur de transcription nucléaire κ B dans la maladie d'Alzheimer et dans la toxicité du peptide β -amyloïde

Le rôle du NF- κ B dans la MA n'est pas bien compris. Dans les désordres neurodégénératifs chroniques reliés au vieillissement, l'activité du NF- κ B est augmentée dans les neurones et les cellules gliales. Dans la MA, des études *post-mortem* montrent que l'immunoréactivité à la sous-unité p65 est plus élevée dans les astrocytes et les neurones situés autour des plaques séniles (Kaltschmidt *et al.*, 1997). Hors, le promoteur du gène du peptide précurseur de l'amyloïde contient la séquence κ B (Grilli *et al.*, 1995). Chez les cellules neuronales, l'activation du NF- κ B par IL-1 β entraîne une augmentation du niveau de l'ARN messager du PPA (Grilli *et al.*, 1996). La surexpression du gène du PPA suivant l'activation du NF- κ B pourrait entraîner l'augmentation de la concentration de β A dans le cerveau des patients atteints de la MA, ce qui n'a pas été démontré jusqu'à maintenant. Un des objectifs de ce projet de recherche est d'étudier l'implication du NF- κ B dans la synthèse du β A.

Nous savons également qu'il y a présence d'un stress oxydant et de processus apoptotiques dans le cerveau des patients atteints de la MA, deux phénomènes associés à

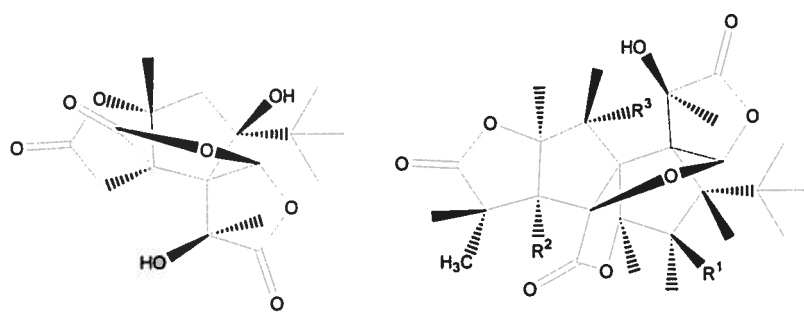
la présence du β A. Nous venons de voir que dans les cellules cérébrales, le NF- κ B est régulé par le potentiel d'oxydoréduction intracellulaire et que son activation peut avoir des effets anti- et pro-apoptotiques. L'activation du NF- κ B est plus importante dans les régions cérébrales où les dommages oxydatifs sont élevés (Lovell *et al.*, 2000). Les études *in vitro* démontrent que 1) le β A, à certaines concentrations, peut activer le NF- κ B et que 2) cette activation serait anti-apoptotique. En effet, sur des neurones en culture primaire, des concentrations de β A₁₋₄₀ et β A₂₅₋₃₅ de l'ordre du nM activent le NF- κ B et la survie cellulaire est augmentée. À des concentrations de plus de 10 μ M, il y a absence d'activation du NF- κ B et la mortalité cellulaire est élevée (Kaltschmidt *et al.*, 1997). Guo, Robinson et Mattson (1998) ont démontré, sur les cellules PC12 différenciées exprimant une mutation sur le gène PS-1 associé à la MA (L286V), que l' α -PPA_s active le NF- κ B et prévient l'apoptose induite par le β A₁₋₄₂. De plus, le traitement de ces cellules avec un bloqueur du site κ B inhibe l'action anti-apoptotique de l' α -PPA_s (Guo, Robinson et Mattson, 1998). Les cellules rC18, une lignée de PC12 caractérisée par l'activité constitutive plus élevée du NF- κ B, résistent mieux au stress oxydant induit par le β A comparativement aux PC12 normales (Lezoualc'h *et al.*, 1998). Ces études suggèrent que le β A a un rôle à jouer dans l'activation du NF- κ B observée dans la MA et que cette activation serait un mécanisme protecteur contre la toxicité du β A. Le β A pourrait activer le NF- κ B notamment par sa production de H₂O₂ et de radicaux libres puisque le NF- κ B est très sensible au potentiel rédox intracellulaire. À partir de ces informations, nous nous proposons d'étudier la régulation du NF- κ B par certains composés phénoliques, connus pour leurs propriétés antioxydantes, dans la protection contre la toxicité du β A. Nous nous sommes d'abord intéressés à l'extrait standardisé de *Ginkgo biloba* EGb 761 dont les effets bénéfiques sur la toxicité du β A sont connus.

1.4 L'extrait standardisé de *Ginkgo biloba* EGb 761

1.4.1 La composition de l'EGb 761

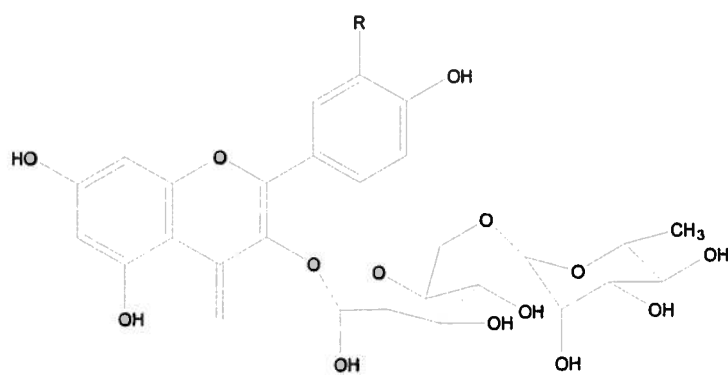
L'EGb 761 est un extrait standardisé de plusieurs constituants chimiques provenant des feuilles de *Ginkgo biloba*. Il est préparé selon une procédure bien définie

(DeFeudis, 1998) et contient 24 % de flavonols glycosylés et 6 % de terpènes lactones (3,1 % ginkgolides A, B et C; 2,9 % bilobalide) (**figure 3**). Certains acides organiques (5 à 10 %) et proanthocyanidines sont aussi présents dans l'EGB 761. Les flavonols glycosylés sont des mono-, di- ou tri-glycosides dont l'aglycone est un flavonol (quercétine, kaempferol ou isorhamnetine) et dont les constituants glycosidiques sont le glucose et le rhamnose. Les terpènes représentent une des deux catégories principales de lipides non saponifiables des plantes, l'autre catégorie étant les stéroïdes. Les ginkgolides présents dans l'EGB 761 sont des di-terpènes alors que le bilobalide est un pentanorditerpène. Les acides organiques jouent un rôle majeur dans la solubilité de l'extrait dans l'eau et possiblement dans la biodisponibilité des flavonoïdes et terpènes qui ne sont pas hydrosolubles (DeFeudis, 1998).

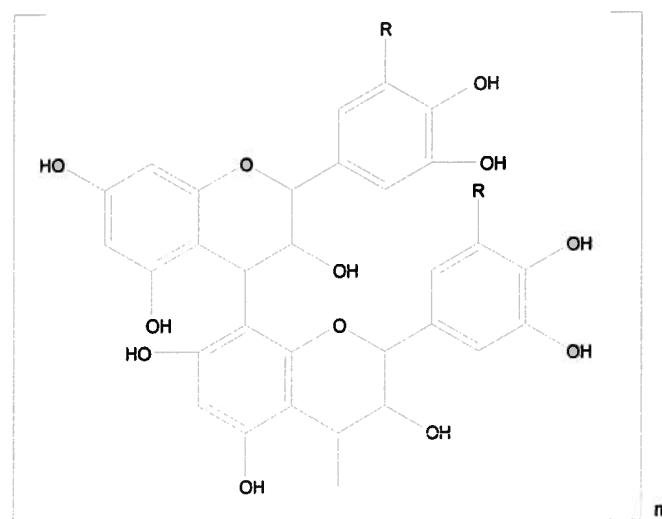


bilobalide

	R ¹	R ²	R ³
Ginkgolide A:	H	OH	H
Ginkgolide B:	H	OH	OH
Ginkgolide C:	OH	OH	OH
Ginkgolide J:	OH	OH	H
Ginkgolide M:	OH	H	OH



R=H:	Kaempférol-3-rutinoside
R=OH:	Quercétine-3-O-rutinoside
R=OCH ₃ :	Isorhamnétine-3-O-rutinoside



R=H:	Procyanidine
R=OH:	Prodelphinidine

Figure 3. Quelques constituants importants de l'EGb 761.

1.4.2 Efficacité de l'EGb 761 dans le traitement de la maladie d'Alzheimer

1.4.2.1 Les études cliniques

Certaines études cliniques ont démontré que l'EGb 761 pourrait avoir un effet bénéfique sur la MA. Hofferberth (1994) a expérimenté le traitement avec l'EGb 761 chez 40 patients ayant une démence sénile de faible à modérée, probablement la MA. 21 patients ont reçu 240 mg/jour de l'EGb 761 alors que 19 patients ont reçu un placebo. Après 1, 2 et 3 mois de traitement avec l'EGb 761, l'évaluation des patients a démontré une amélioration au niveau de la mémoire, de l'attention, des fonctions cognitives et de la vigilance qui était hautement significative. Des résultats similaires ont été obtenus par Kanowski *et al.* (1996). 156 patients ayant une démence présénile ou sénile de faible à modérée de type MA ou de cause multiple ont complété l'étude (79 EGb 761, 77 placebos). Après 24 semaines, la mémoire et l'attention se sont significativement améliorées avec l'EGb 761 comparativement au groupe placebo. Des résultats similaires ont été obtenus par Le Bars *et al.* (1997) avec une dose de 120 mg/jour de l'EGb 761.

1.4.2.2 Les études chez les animaux

La MA se caractérise phénotypiquement par un déclin cognitif progressif, particulièrement par la perte de la mémoire, de l'apprentissage et de l'attention (Haxby *et al.*, 1992; Mega *et al.*, 1996; Parasuraman et Martin, 1994). Les effets bénéfiques d'un traitement chronique avec l'EGb 761 sur les déficits cognitifs ont été clairement démontrés chez la souris transgénique Tg2576 qui surexprime une forme mutante de la PPA. Ces souris sont caractérisées par des déficits cognitifs liés au vieillissement. Le dépôt de plaques de β A et un stress oxydant s'observe dans le cerveau de ces souris. Le traitement de ces souris avec l'EGb 761 (70 mg/kg/jour dans l'eau) sur une période de 6 mois a mené à une amélioration des performances dans l'apprentissage spatial, ce qui a été évaluée par le test de la piscine (Stackman *et al.*, 2003).

1.4.3 Les mécanismes de protection par l'EGb 761 contre la toxicité du β A

Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les effets bénéfiques de l'EGb 761, autant chez l'humain que sur les modèles animaux, ne sont pas très bien connus. Ses effets bénéfiques pourraient passer par l'inhibition de la fibrillation du β A et par sa capacité à protéger les cellules cérébrales du stress oxydant et de l'apoptose induits par le β A.

1.4.3.1 Les effets anti-fibrillaire de l'EGb 761

Récemment, il a été démontré que l'EGb 761 inhibe l'aggrégation du β A. En utilisant les cellules N2a swe/ Δ 9, Luo *et al.* (2002) ont rapporté que l'EGb 761 (100 μ g/mL) inhibe la formation de fibrilles de β A. La diminution de la fibrillogénèse du β A en présence d'EGb 761 a été observée dans le milieu de culture des N2a swe/ Δ 9 sécrétant le β A et *in vitro* en présence de β A₁₋₄₀ (46 μ M, 96 heures à la température de la pièce) en solution. L'inhibition de la fibrillation du β A par l'EGb 761 dans les cultures de N2a swe/ Δ 9 est associée avec une diminution de l'apoptose initiée par les mitochondries. L'inhibition de la fibrillation du β A pourrait donc être une cible préventive ou thérapeutique intéressante puisque la fibrillation du β A est à la base de son activité neurotoxique.

1.4.3.2 Les effets anti-oxydants et la protection contre les radicaux libres par l'EGb 761

L'EGb 761 a des effets protecteurs contre le stress oxydant induit par le β A. Sur les cellules d'hippocampe de rat en culture primaire, le traitement avec l'EGb 761 (100 μ g/mL) protège contre la toxicité du β A₂₅₋₃₅ (25 μ M, 24 heures) et du β A₁₋₄₀ (5 μ M, 24 heures) et inhibe l'accumulation de ROS (Bastianetto et Quirion, 2002). L'EGb 761 peut également protéger les cellules de l'hippocampe contre la toxicité du H₂O₂ (50-150 μ M), un médiateur de la toxicité du β A (Bastianetto *et al.*, 2000). Sur les cellules N2a swe/ Δ 9, dans lesquelles il y a une élévation du niveau de H₂O₂ due à l'augmentation de la sécrétion de β A et à son accumulation intracellulaire, l'EGb 761 diminue le niveau de ROS associés au H₂O₂ (Smith et Luo, 2003). La même observation a été faite avec un

modèle *in vivo* de la MA, un vers *Caenorhabditis elegans* transgénique exprimant de façon constitutive le β A humain (Smith et Luo, 2003).

1.4.3.3 Les effets anti-apoptotiques de l'EGB 761

Les recherches ont démontré que l'EGB 761 protège les cellules contre l'apoptose induite par le β A. Dans les cellules d'hippocampe de rats en culture primaire, le co-traitement avec l'EGB 761 (100 μ g/mL, 24 heures) bloque complètement l'apoptose induite par le β A₂₅₋₃₅ (25 μ M) (Bastianetto *et al.*, 2000; Bastianetto et Quirion, 2002). Luo *et al.* (2002) ont obtenu des résultats similaires en utilisant les cellules N2a swe/ Δ 9. Le pré-traitement de ces cellules pendant 48 heures avec l'EGB 761 (100 μ g/mL) avant l'induction de l'expression du transgène atténue l'apoptose et réduit l'activation de la caspase 3 comparativement aux cellules swe/ Δ 9 n'ayant pas reçu de pré-traitement avec l'EGB 761. Sur les cellules PC12, un co-traitement de 24 heures avec l'EGB 761 (1 et 100 μ g/mL) diminue l'apoptose induite par le β A₁₋₄₂ (50 μ M) (Yao, Drieu et Papadopoulos, 2001).

L'EGB 761 a des effets sur la transcription de plusieurs gènes qui pourraient expliquer sa capacité à prévenir l'apoptose induite par le β A. La caspase 12 est un médiateur de l'apoptose qui est activée par un stress au niveau du réticulum endoplasmique (Nakagawa *et al.*, 2000). Nagakawa *et al.* (2000) ont démontré que le β A₁₋₄₀ (20 μ M) n'induit pas l'apoptose chez les neurones corticaux de souris déficientes en caspase 12. De façon intéressante, dans les cellules PC12 différenciées avec la NGF, la caspase 12 est sous-exprimée lorsque ces cellules sont traitées avec l'EGB 761 (Smith *et al.*, 2002; Smith et Luo, 2004).

Les propriétés neuroprotectrices de l'EGB 761 pourraient aussi passer par la modulation de l'expression de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique. Sur des neurones corticaux transgéniques de souris exprimant la Bcl-2 humaine, l'apoptose induite par le β A₂₅₋₃₅ (10 μ M) et le β A₁₋₄₂ (20 μ M) est inhibée (Saillé *et al.*, 1998). L'EGB 761 a la capacité d'augmenter l'expression de Bcl-2, tel que démontré sur des cellules PC12 différenciées avec la NGF (Smith *et al.*, 2002; Smith et Luo, 2004).

Ces données démontrent que l'EGB 761 protège les cellules cérébrales du stress oxydant et de l'apoptose induits par le β A. Comme le NF- κ B est sensible au potentiel rédox intracellulaire et amène la transcription de plusieurs gènes anti- et pro-apoptotiques, nous avons l'intention de faire l'étude de la modulation du NF- κ B par l'EGB 761 dans la protection contre la toxicité du β A.

1.4.4 Rôle des flavonoïdes et des terpénoïdes dans la protection par l'EGB 761 contre la toxicité du peptide β -amyloïde

Les mécanismes qui sous-tendent les effets bénéfiques de l'EGB 761 dans le système nerveux central (SNC) contre la toxicité du β A semblent reliés à l'action synergique de ses différents constituants. Par contre, certaines de ses composantes peuvent être associées à des mécanismes protecteurs. Sur des cultures primaires de cellules d'hippocampe de rats, le bilobalide (10 μ g/mL) et le ginkgolide B (10 μ g/mL) n'affectent pas la production de ROS induite par le β A₂₅₋₃₅ (25 μ M, 24 heures) mais la fraction des flavonoïdes (CP205, 25 μ g/mL) diminuent significativement cette production et augmente la survie cellulaire (Bastianetto et Quirion, 2002). Le pré-traitement de neuroblastes humains SH-SY5Y pendant 3 heures avec le ginkgolide A ou B (1 μ M) rend ces cellules résistantes à la toxicité du β A₁₋₄₂ (10 μ M). Le pré-traitement de ces mêmes cellules avec la quercétine (25 μ M) n'affecte pas la toxicité du β A₁₋₄₂ (Bate, Salmona et Williams, 2004). L'activité de la caspase 3 (marqueur apoptotique) en réponse au β A₁₋₄₂ (10 μ M) est réduite dans les neurones corticaux en culture primaire pré-traités avec le ginkgolide B. Le pré-traitement de ces mêmes cellules avec la quercétine (25 μ M) n'affecte pas la toxicité du β A₁₋₄₂ (Bate, Salmona et Williams, 2004). *In vitro*, Luo *et al.* (2002) ont démontré que le bilobalide et le ginkgolide J inhibent la fibrillation du β A₁₋₄₀ à 73 et 72 % respectivement, comparativement à l'inhibition par l'EGB 761. Les ginkgolides A, B et C ont un effet beaucoup moins important avec une inhibition de 35, 20 et 42 % respectivement.

Certains des composés contenus dans l'EGB 761 ont donc des pouvoirs anti-oxydants, anti-apoptotiques et anti-fibrillaires. L'effet des flavonoïdes de l'EGB 761 sur

la fibrillation du β A n'étant pas connu, nous nous intéresserons à cette question. De plus, pour mieux comprendre la modulation du NF- κ B par l'EGB 761, nous nous suggérons d'étudier l'effet de certaines des sous-fractions de cet extrait (flavonoïdes et ginkgolide B) sur la modulation de ce facteur de transcription. Outre l'EGB 761, deux autres composés phénoliques ont retenu notre attention, soit le tyrosol et l'OH-tyrosol.

1.5 Le tyrosol et l'hydroxytyrosol

Certaines molécules de l'alimentation pourraient avoir un effet préventif sur la MA. Une étude épidémiologique a montré que la diète méditerranéenne est associée à une protection contre la MA tel qu'observé dans la population âgée du sud de l'Italie (Panza *et al.*, 2004). Cette diète est caractérisée par son contenu élevé en fruits, légumes, poissons et huile d'olive comme source majeur de lipides. Les composés participants à l'effet protecteur de cette diète ne sont pas bien connus mais l'huile d'olive contient des composés phénoliques ayant des propriétés antioxydantes, tel le tyrosol et l'OH-tyrosol qui pourraient être impliqués dans la protection contre la MA.

1.5.1 Le tyrosol et l'hydroxytyrosol dans la diète méditerranéenne

Avec l'oleuropéine, le tyrosol et l'OH-tyrosol (**figure 4**) font partie des trois composés phénoliques les plus importants en concentration dans l'huile d'olive. La concentration de tyrosol et d'OH-tyrosol diffère selon le type d'huile d'olive. En effet, leur concentration est plus élevée dans l'huile d'olive extra vierge que dans l'huile d'olive raffinée. Une première étude portant sur 30 huiles d'olive se retrouvant sur le marché italien a démontré que l'huile d'olive extra-vierge contient 14,42 mg/kg d'OH-tyrosol et 27,45 mg/kg de tyrosol alors que l'huile d'olive raffinée contient 1,74 mg/kg d'OH-tyrosol et 2,98 mg/kg de tyrosol (Owen *et al.*, 2000). Murkovic *et al.* (2004) ont obtenu en tyrosol de 1,4 à 29 mg/kg, dépendamment des échantillons, dans une huile d'olive préparée au laboratoire à partir d'olives de Grèce et récoltées en 2001. Le tyrosol se retrouve également dans le champagne et le vin blanc. Au niveau du champagne, la concentration en tyrosol varie selon l'année et le cépage, variant de 12 à 36 mg/L ce qui

représente de 29 à 47 % de la fraction phénolique des champagnes (Chamkha *et al.*, 2003). Dans les vins blancs d'Espagne et du Portugal (Alvarinho, Albarino et Loureiro, 1997 et 1998), la concentration de tyrosol se situe entre 0,95 à 3,73 mg/L (Andrade *et al.*, 2001).

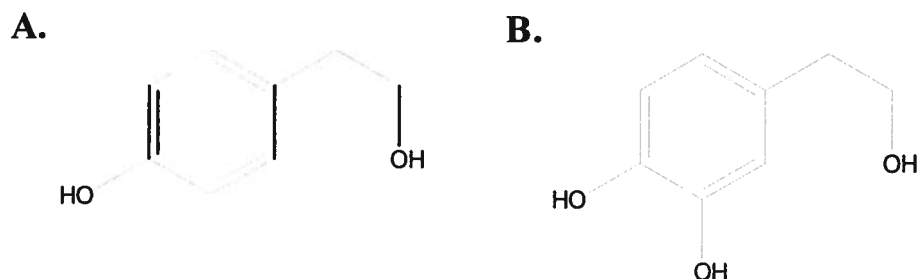


Figure 4. Le tyrosol (A) et l'OH-tyrosol (B).

1.5.2 Le potentiel antioxydant du tyrosol et de l'hydroxytyrosol

L'effet bénéfique de la diète méditerranéenne sur la santé a d'abord été constaté au niveau des maladies coronariennes et de l'athérosclérose dans lesquelles est impliqué un stress oxydant. Plusieurs études ont démontré que les composés phénoliques de l'huile d'olive sont de puissants inhibiteurs de l'oxydation des LDL *in vitro* (Leenen *et al.*, 2002; Visioli *et al.*, 1995; Visioli et Galli, 1994) et *in vivo* (Marrugat *et al.*, 2004). Hors, l'oxydation *in vivo* des LDL est liée à la formation des plaques d'athérome qui contribuent au développement de maladies coronariennes. Typiquement, l'OH-tyrosol est un antioxydant plus efficace que le tyrosol. L'OH-tyrosol diminue la production de diphénol produit par l'attaque du radical hydroxyl (OH•) sur l'acide salicylique (1,24 mM) (Owen *et al.*, 2000) et la formation de l'anion superoxyde (O₂•⁻) dans un système xantine/xantine oxydase (9,1 μM) (Visioli, Bellomo et Galli, 1998). La protection contre la toxicité du H₂O₂ (10 mM), un médiateur de la toxicité du βA, a été démontrée chez les cellules Caco-2 (Manna *et al.*, 1997). Cette protection a été démontrée à des concentrations d'OH-tyrosol de 100 à 500 μM. Pour ce qui est du tyrosol, les études sur son potentiel antioxydant sont contradictoires. L'étude par Owen *et al.* (2000) démontre que le tyrosol (1 à 4 mM) diminue la production de diphénol produit par l'attaque du OH• sur l'acide salicylique. Chez les cellules Caco-2, le tyrosol (jusqu'à 500 μM) ne protège pas de la toxicité du H₂O₂ (10 mM) (Manna *et al.*, 1997). À notre connaissance, il n'y a

aucune étude ayant porté sur le potentiel neuroprotecteur du tyrosol et de l'OH-tyrosol contre les ROS, le H₂O₂ ou le β A, ce que nous nous proposons d'explorer. Puisque ces deux composés ont des pouvoirs antioxydants, nous étudierons également leur effet sur le NF- κ B dans la protection contre la toxicité du β A.

Ce projet de recherche consiste à faire l'étude de divers mécanismes de neuroprotection par l'EGB 761, le tyrosol et l'OH-tyrosol contre la toxicité du β A et étudier le rôle du NF- κ B dans la synthèse et la toxicité du β A. À la lumière des informations obtenues par la revue de littérature présentée ci-dessus, nous avons déterminé quatre objectifs principaux. L'EGB 761 étant reconnu pour empêcher la fibrillation du β A, sa forme toxique, notre premier objectif est d'étudier, par microscopie électronique, l'implication des flavonoïdes et du ginkgolide B (sous-fractions de cet extrait) dans ce mécanisme de protection. Notre second objectif est d'étudier les effets neuroprotecteurs du tyrosol et de l'OH-tyrosol, deux molécules antioxydantes de l'huile d'olive, contre la toxicité du β A par les tests de survie cellulaire XTT et de cytotoxicité LDH. Plus précisément, nous évaluerons certains mécanismes de protection pouvant être impliqués, notamment le potentiel antioxydant, étudié avec les tests XTT et LDH, et l'effet anti-apoptotique étudié par cytométrie en flux. Notre troisième objectif est d'analyser, par immunobuvardage, la modulation du NF- κ B dans la protection par l'extrait standardisé EGB 761 ainsi que par ses sous-fractions, par le tyrosol et par l'OH-tyrosol. Ces trois premiers objectifs seront réalisés sur des neuroblastes neuro2a en culture. Puisque la séquence κ B est présente sur le gène PPA, notre dernier objectif est de démontrer le rôle du NF- κ B dans la synthèse du β A par la détection de ce peptide toxique chez les souris p50 $-/-$ par ELISA. La méthodologie utilisée pour atteindre ces différents objectifs est détaillée au chapitre 2. Le chapitre 3 est une description exhaustive des résultats obtenus et seront discutés au chapitre 4. Pour conclure, les réponses obtenues par ce projet de recherche permettront d'élaborer certaines perspectives et l'avenir de l'EGB 761, du tyrosol et de l'OH-tyrosol dans le traitement de la MA sera abordé.

CHAPITRE 2

Matériel et méthodes

2.1 Culture des neuroblastes murins N2a

Les cellules N2a (ATCC, États-Unis) ont étéensemencées à une densité de $4,5 \times 10^4$ cellules/cm² dans des flacons de 25 ou 75 cm² ou dans des plaques de 6, 24 ou 96 puits (Falcon Primaria, Becton Dickinson, NJ, États-Unis), selon les essais. Le milieu de culture qui a été utilisé est le MegaCell Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12-Ham contenant 3 % de serum fœtal bovin (FBS pour «foetal bovine serum»), 25 U/mL de pénicilline et 25 µg/mL de streptomycine (Sigma, MO, États-Unis). Les cellules ont été incubées pendant 48 heures à 37 °C, 5 % CO₂ (Incubateur HERA cell, Kendo laboratory, Hanau, Allemagne).

2.2 Mécanismes de protection de l'EGB 761 contre la toxicité du peptide β-amyloïde et implication des flavonoïdes et du ginkgolide B.

2.2.1 Fibrillation du peptide β-amyloïde et mortalité/survie cellulaire.

Préparation des solutions de βA₂₅₋₃₅ et βA₁₋₄₀ : Le Aβ₂₅₋₃₅ (American Peptide, Sunnyvale, CA, États-Unis) a été dissout dans l'eau distillée (H₂O_d) à une concentration de 10 mg/mL (solution mère). Des aliquotes de 10 µL ont été préparées et conservées à -20 °C. Des solutions fraîches de βA₂₅₋₃₅ à 1 mg/mL contenant EGB 761 à 20 µg/mL (Beaufour IPSEN, France), CP205 à 10 µg/mL (Extrait standardisé EGB 761 dont les terpénoïdes ont été retirés, Beaufour IPSEN, France) ou BN52021 à 10 µg/mL (Ginkgolide B, Beaufour IPSEN, France) ont été préparées dans H₂O_d. Une solution contenant seulement βA₂₅₋₃₅ à 1 mg/mL dans H₂O_d (contrôle négatif) a également été préparées. Pour induire la fibrillogénèse, ces 4 solutions ont été incubées pendant 48 heures à 37 °C, 5 % dioxyde de carbone (CO₂). Le βA₁₋₄₀ (American Peptide, Sunnyvale, CA, États-Unis) a été dissout dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma, MO, États-Unis) à une concentration de 10 mg/mL (solution mère). Des aliquotes de 10 µL ont été préparés et conservés à -20 °C.

Les solutions fraîches de βA_{1-40} à 1 mg/mL contenant l'EGb 761 à 20 μ g/mL, le CP205 à 10 μ g/mL, le BN52021 à 10 μ g/mL ou le rouge Congo à 5 μ M (contrôle positif) ont été préparées dans le Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS) (Sigma, MO, États-Unis). Une solution contenant seulement βA_{1-40} à 1 mg/mL dans DPBS (contrôle négatif) a également été préparée. Pour induire la fibrillation (vieillesse) du βA_{1-40} , ces 5 solutions ont été incubées pendant 48 heures à 37 °C, 5 % CO₂ (Incubateur HERA cell, Kendo laboratory, Hanau, Allemagne). La fibrillation du βA_{1-40} a été confirmée par microscopie électronique.

Microscopie électronique : Suivant l'incubation de 48 heures à 37 °C, les différentes solutions de βA_{1-40} ont été déposées sur des grilles d'argent. L'état de la fibrillation du peptide a été observé à l'aide du microscope électronique Philips modèle EM208S.

Traitement des cellules N2a: Suivant l'incubation de 48 heures à 37 °C, les différentes solutions de βA_{1-40} et de βA_{25-35} ont été diluées avec le milieu MegaCell-DMEM/F12-Ham (sans FBS, sans antibiotique) pour obtenir une concentration finale en βA de 200 μ g/mL. Des solutions de βA_{25-35} et βA_{1-40} non fibrillés (contrôles positifs) ont été préparées à partir des solutions mères en dissolvant βA_{25-35} dans H₂O et βA_{1-40} dans DPBS à une concentration de 1 mg/mL et ensuite à une concentration finale de 200 μ g/mL dans MegaCell-DMEM/F12-Ham. Les cellules N2a ont été préalablement cultivées dans les plaques de 96 puits (voir section 2.1). Le milieu de culture a été retiré des plaques et les cellules N2a ont été traitées avec les solutions de traitement (50 μ L/puit, 4 puits/condition). Pour les puits témoins, 50 μ L de MegaCell-DMEM/F12-Ham a été ajouté. Les cellules ont été incubées 24 heures à 37 °C, 5 % CO₂.

Test de cytotoxicité LDH: La mortalité cellulaire a été mesurée en utilisant le « cytotoxicity detection kit LDH » (Roche, Allemagne). Il s'agit d'un test colorimétrique pour la quantification de la mortalité et de la lyse cellulaire basé sur la mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) relâchée dans le surnageant par les cellules endommagées. Dans une première étape, la LDH libérée dans le milieu de culture catalyse la réduction du NAD⁺ (nicotinamide adénine dinucléotide) en NADH/H⁺ par l'oxydation de lactate en pyruvate. Dans une deuxième étape, la diaphorase transfère H⁺ provenant du NADH/H⁺

au chlorure de 2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium (INT) (jaune pâle) qui sera réduit en formazan (rouge). Suivant l'incubation des cellules traitées pendant 24 heures à 37 °C, le surnageant de chaque puit a été récupéré et dilué 1:30 dans H₂Od. 100 µL des surnageants dilués ainsi que 100 µL du mélange réactionnel LDH fraîchement préparé ont été déposés dans les puits de nouvelles plaques de 96 puits. Les plaques ont ensuite été agitées et incubées 15 minutes à la température de la pièce (TP), protégées de la lumière. L'absorbance a été mesurée à 490 nm. La longueur d'onde de référence utilisée est de 630 nm (MRXtc microplate reader, Revelation Software version 4.02, Dynex Technologies Inc., États-Unis).

Test de survie cellulaire XTT: Le «*In vitro* Toxicology Assay Kit XTT Based » (Sigma, MO, États-Unis) a été utilisé pour mesurer la survie cellulaire. Ce test permet de mesurer l'activité des déshydrogénases mitochondriales des cellules. Chez les cellules viables, ces enzymes clivent le cycle tétrazolium du sel de 2,3-bis[2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl]-2H-tétrazolium-5-carboxyanilide (XTT) ce qui entraîne la formation de cristaux de formazan orange qui sont hydrosolubles. Plus la coloration est intense, plus la survie cellulaire est importante. Chaque vial contenant 5 mg de XTT + 1 % de phénazine methosulfate a été reconstitué avec le milieu MegaCell-DMEM/F12-Ham à 1 mg/mL et placé à 56 °C pendant 20 minutes. La solution de travail XTT a été préparée en dissolvant le XTT préalablement reconstitué à 20 % v/v dans MegaCell-DMEM/F12-Ham à 37 °C. Le surnageant des plaques contenant les traitements a été retiré des plaques de 96 et 100 µL de la solution de travail XTT a été ajouté dans chaque puit. Les cellules ont ensuite été incubées à 37 °C, 5 % CO₂ pendant 2 heures. Les plaques ont été vigoureusement agitées et l'absorbance a été mesurée à 450 nm. La longueur d'onde de référence utilisée est de 630 nm (MRXtc microplate reader, Revelation Software version 4.02, Dynex Technologies Inc., États-Unis).

2.2.2 Modulation du facteur de transcription nucléaire κB

Traitement des cellules N2a : Les cellules N2a ont été préalablement cultivées dans les plaques de 6 puits. Le βA₂₅₋₃₅ a préalablement été dissout à 1 mg/mL dans H₂Od et fibrillé

à 37 °C pendant 48 heures. Le jour de l'essai, les solutions de traitement EGb 761 et βA_{25-35} 2 X ont été préparées dans le MegaCell DMEM/F12-Ham (sans FBS, sans antibiotique). Le milieu de culture a été retiré des plaques et les cellules ont été traitées avec 250 μ L de solution-traitement 2 X et 250 μ L de MegaCell DMEM/F12-Ham. Dans le cas de cellules recevant des co-traitements, elles ont été traitées avec 250 μ L de chacune des solutions-traitements. 500 μ L de MegaCell DMEM/F12-Ham a été déposé dans les puits témoins. Les cellules ont été incubées 30 minutes à 37 °C, 5 % CO₂. Pour ce qui est des traitements avec la cycloheximide, les cellules ont été incubées 2 heures à 37 °C, 5 % CO₂ avec la cycloheximide. La cycloheximide a ensuite été retirée et les cellules ont été incubées pendant 15 minutes à 37 °C, 5 % CO₂ avec EGb 761.

Immunobuvardage: Suivant les traitements, les protéines cytoplasmiques et nucléaires ont été extraites avec une trousse d'extraction nucléaire commerciale (Active Motif, CA, États-Unis). Les protéines ont été dosées par la méthode à l'acide bicinchoninique (BCA Protein assay kit, Pierce, États-Unis) et séparées par électrophorèse sur gel (8 cm x 10 cm) de polyacrylamide-sodium dodecyl sulfate. 10 ou 20 μ g de protéines a été déposé dans chaque puit des gels de polyacrylamide (gel de compression 4 %, gel de séparation 10 %). Sur chaque gel, un puit a été utilisé pour le dépôt de 5 μ L d'un marqueur de poids moléculaire de type kaléidoscope (Biorad, CA, États-Unis). Les protéines ont été séparées pendant 2 heures avec un courant de 120 V. Elles ont ensuite été transférées sur une membrane de fluorure de polyvinylidène (Biorad, CA, États-Unis) pendant 2 heures à 0,3 A. Les membranes ont été incubées pour la nuit à 4 °C dans la solution de blocage (5 % lait en poudre sans gras (LPSG) dans tween-tris buffer saline (TBST)). Elles ont ensuite été placées dans les tubes de 50 mL et lavées avec le TBST 3 fois 10 minutes à TP. Le TBST a été complètement retiré et 2 mL de la solution d'anticorps primaire suivante a été ajoutée : 1 % p/v d'albumine sérique bovine (Omnipur, EMD, États-Unis) et 0,05 % p/v de sodium azide (Sigma, MO, États-Unis) dans TBST. Le volume d'anticorps primaire nécessaire pour obtenir la dilution désirée a été ajouté : anti-p50 de lapin (DeltaBiolabs, États-Unis) et anti-p65 de lapin (DeltaBiolabs) = 1 :100; anti-I κ B β de lapin (SantaCruz, États-Unis) = 1 :500. Les membranes ont été incubées une heure à TP dans l'anticorps primaire. Elles ont été lavées 3 fois 10 minutes avec TBST. Le TBST a été complètement

retiré et 2 mL de solution contenant l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la peroxidase de raifort (dilution 1 :10 000; Sigma, MO, États-Unis) a été ajouté. Les membranes ont été incubées une heure à TP dans l'anticorps secondaire. Elles ont été lavées 3 fois 10 minutes avec TBST. Les protéines d'intérêt ont été révélées par ECL : 14 μ L d'acide p-coumaric dans DMSO, 1,4 mL de luminol 1,25 mM (Sigma, MO, États-Unis) dans Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 et 0,5 μ L H₂O₂ 30 % (SIGMA, Mo, États-Unis) (pour une membrane 6 x 9 cm). Les films (Kodak X-OMAT LS) ont été exposés aux membranes pendant 30 minutes et ont été développés avec le Kodak X-OMAT 1000A Processor. Les films ont été numérisés avec le Fluor-STM MultiImager (Biorad, CA, États-Unis) et l'intensité des bandes mesurée avec le programme Multi-analyst version 1.1 (Biorad, CA, États-Unis). Pour contrôler la quantité de protéines déposée dans chaque puit du gel, les membranes ont été décapées avec la solution « ReBlot Plus Strong » (Chemicon International, CA, États-Unis) et incubé avec un anticorps de souris anti- β -actine (dilution 1 :3 000, Sigma, MO, États-Unis) pour la fraction cytoplasmique et un anti-corps de souris anti-histone désacétylase (HDAC) 1 (dilution 1 : 200, Santa Cruz, CA, États-Unis) pour la fraction nucléaire. L'anticorps de souris anti-NeuN (dilution 1 :1 000, Chemicon International, CA, États-Unis) a été utilisé pour confirmer la nature neuronale du modèle cellulaire.

2.3 Effet neuroprotecteur et mécanismes de protection du tyrosol et de l'hydroxytyrosol contre la toxicité du peptide β -amyloïde.

2.3.1 Effet neuroprotecteur du tyrosol et de l'hydroxytyrosol

Préparation des solutions de tyrosol, d'OH-tyrosol et de β A₂₅₋₃₅: Le β A₂₅₋₃₅ a préalablement été dissout à 1 mg/mL dans H₂O_d et fibrillé à 37 °C pendant 48 heures. Le jour de l'essai, les solutions de traitement de tyrosol (Sigma, MO, États-Unis), d'OH-tyrosol (Cayman chemical, MI, USA) et β A₂₅₋₃₅ 2 X ont été préparées dans le MegaCell DMEM/F12-Ham (sans FBS, sans antibiotique).

Traitement des cellules N2a: Les cellules N2a ont été préalablement cultivées dans des plaques de 96 puits (voir section 2.1). Le milieu de culture a été retiré des plaques et les

cellules ont été traitées avec 25 μ L de solution-traitement 2 X et 25 μ L de MegaCell DMEM/F12-Ham. Dans le cas de cellules recevant des co-traitements, elles ont été traitées avec 25 μ L de chacune des solutions-traitements. 50 μ L de MegaCell DMEM/F12-Ham a été déposé dans les puits des cellules témoins. Les cellules ont été incubées 24 heures à 37 °C, 5 % CO₂.

Test de cytotoxicité LDH: La mortalité cellulaire a été mesurée en utilisant le « cytotoxicity detection kit LDH » (voir section 2.2.1).

Test de survie cellulaire XTT: La survie cellulaire a été mesurée en utilisant le « *In vitro* Toxicology Assay Kit XTT Based » (voir section 2.2.1).

2.3.2 Détermination du potentiel antioxydant du tyrosol et de l'hydroxytyrosol.

Préparation des solutions de tyrosol, d'OH-tyrosol et de H₂O₂: Le jour de l'essai, les solutions de traitement de tyrosol (Sigma, MO, États-Unis), d'OH-tyrosol (Cayman chemical, MI, USA) et de H₂O₂ 2 X ont été préparées dans le MegaCell DMEM/F12-Ham (sans FBS, sans antibiotique).

Traitement des cellules N2a: Pour le traitement des cellules, voir la section 2.3.1.

Test de cytotoxicité LDH: La mortalité cellulaire a été mesurée en utilisant le « cytotoxicity detection kit LDH » (voir section 2.2.1).

Test de survie cellulaire XTT: La survie cellulaire a été mesurée en utilisant le « *In vitro* Toxicology Assay Kit XTT Based » (voir section 2.2.1).

Microscopie : Suivant le traitement des cellules N2a pour les tests de survie et de cytotoxicité cellulaire, la morphologie des cellules a été observée par microscopie (Eclipse TS100, Nikon, Japon). Les cellules ont été photographiées (COOLPix 990 MDC Lens Nikon, Japon).

2.3.3 Détermination du potentiel anti-apoptotique du tyrosol et de l'hydroxytyrosol.

Préparation des solutions de tyrosol, d'OH-tyrosol et de βA_{25-35} : Pour la préparation des solutions de traitement, voir la section 2.3.1.

Traitement des cellules N2a : Les cellules N2a ont été préalablement cultivées dans des plaques de 6 puits (voir section 2.1). Le milieu de culture a été retiré des plaques et les cellules ont été traitées avec 250 μ L de solution-traitement 2 X et 250 μ L de MegaCell DMEM/F12-Ham. Dans le cas de cellules recevant des co-traitements, elles ont été traitées avec 250 μ L de chacune des solutions-traitements. 500 μ L de MegaCell DMEM/F12-Ham a été déposé dans les puits des cellules témoins. Les cellules ont été incubées 24 heures à 37 °C, 5 % CO₂.

Cytométrie en flux (annexine V-FITC) : Les premiers événements observés chez les cellules en apoptose sont les changements au niveau de la membrane plasmique. Les phosphatidylsérines de la membrane sont exposées à la surface de la membrane plasmique et donc à l'environnement de la cellule. L'annexine V est une protéine qui a une très grande affinité pour les phosphatidylsérines et va donc se lier à celles qui sont exposées à la surface des cellules en apoptose. L'annexine V est généralement couplée à un fluorochrome (ici le FITC pour «fluorescein isothiocyanate») pour permettre l'identification des cellules en apoptose par cytométrie en flux. Suivant l'incubation des cellules pendant 24 heures, les traitements ont été retirés des puits. 1 mL de PBS a été ajouté dans chaque puit et les cellules ont été décollées à l'aide de grattoirs. Les cellules ont été transférées dans des tubes de 1,5 mL et centrifugées 2 minutes à 3 200 rpm. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été lavées une 2^{ème} fois avec le PBS. Suivant la seconde centrifugation, le surnageant a été éliminé. Les cellules ont ensuite été suspendues dans 100 μ L de tampon de liaison (10 mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) et transférées dans des tubes de 5 mL. 3 μ L d'annexine V-FITC (BD Bioaciences Pharmingen, Etats-Unis) a été ajouté dans chacun des tubes. Les tubes ont été agités doucement au vortex et ils ont été incubés 15 minutes à TP dans le noir. 400

μ L de tampon de liaison a été ajouté dans chaque tube. L'analyse par cytométrie en flux a été faite avec l'appareil FACScan (Becton Dickinson, CA, États-Unis).

2.3.4 Modulation du facteur de transcription nucléaire κ B par le tyrosol et l'hydroxytyrosol.

Préparation des solutions de tyrosol, d'OH-tyrosol et de βA_{25-35} : Pour la préparation des solutions de traitement, voir la section 2.3.1.

Traitement des cellules N2a : Les cellules N2a ont été traitées tel que décrit à la section 2.3.3. à l'exception de la durée du temps d'incubation avec le traitement qui est de 30 minutes à 37 °C, 5 % CO₂.

Immunobuvardage: voir section 2.2.2.

2.3 Implication du facteur de transcription nucléaire κ B dans la synthèse du peptide β -amyloïde : détection du peptide β -amyloïde chez les souris p50 -/-.

Les souris p50 -/- et les souris sauvages (Jackson, États-Unis) âgées de 6 à 8 semaines ont été décapitées (CISEAU #0412-06, 5 individus par groupe). Les structures suivantes ont été prélevées : cortex frontal, hippocampe, striatum et cortex temporal. Les structures ont été placées dans des tubes, pesées et homogénéisées avec du PBS. Les tubes ont été centrifugés à 1000 rpm pendant 10 minutes à 4 °C. Le βA_{1-40} et le βA_{1-42} dans les surnageants ont été dosés par la méthode ELISA (Colorimetric Immunoassay kit, Alpc Diagnostics, Salem, États-Unis).

2.4 Analyse statistique

Le programme GraphPad InStat tm version 2.05a a été utilisé pour l'analyse statistique. L'analyse statistique a été faite par one-way ANOVA suivie du post test Student-Newman-Keuls. Les résultats sont considérés significatifs lorsque $P < 0,05$.

CHAPITRE 3

Résultats

Dans le cadre de ce projet de recherche, nous nous proposons de faire l'étude de divers mécanismes de neuroprotection par l'EGb 761, le tyrosol et l'OH-tyrosol contre la toxicité du β A et d'analyser le rôle du NF- κ B dans la synthèse et la toxicité du β A. Pour y parvenir, nous nous étions fixés quatre objectifs principaux. Notre premier objectif était d'étudier, par microscopie électronique, le rôle des flavonoïdes et du ginkgolide B dans l'inhibition de la fibrillation du β A par l'EGb 761. Notre second objectif était d'évaluer l'effet neuroprotecteur du tyrosol et de l'OH-tyrosol contre la toxicité du β A sur les cellules N2a et d'identifier certains mécanismes de protection pouvant être impliqués (potentiel antioxydant, effet anti-apoptotique). Le troisième objectif que nous nous étions fixés était d'étudier le rôle du NF- κ B dans la protection par l'EGb 761 (et certaines de ses sous-fractions), le tyrosol et l'OH-tyrosol. Notre dernier objectif était de démontrer le rôle du NF- κ B dans la synthèse du β A. Ce chapitre présente les résultats obtenus pour réaliser les quatre objectifs mentionnés ci-haut.

3.1 Mécanismes de protection de l'EGb 761 contre la toxicité du peptide β -amyloïde et implication des flavonoïdes et du ginkgolide B.

L'extrait standardisé de *Ginkgo biloba* EGb 761 pourrait améliorer la mémoire et l'apprentissage chez les personnes atteintes de la MA (Hofferberth, 1994; Kanowski *et al.*, 1996; Le Bars *et al.*, 1997) et sur un modèle animal de la MA (Stackman *et al.*, 2003). Il a été démontré, sur des modèles *in vitro* et *in vivo*, que cet extrait protège contre la toxicité du β A (Bastianetto *et al.*, 2000; Bastianetto et Quirion, 2002; Luo *et al.*, 2002; Smith et Luo, 2003; Yao, Drieu et Papadopoulos, 2001). Par contre, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués et les composés de l'extrait responsables des effets bénéfiques demeurent peu connus. Nous nous sommes intéressés à l'effet anti-fibrillaire et à la modulation du NF- κ B par EGb 761 dans la protection contre la toxicité du β A mais également à l'implication de deux sous-fractions de l'extrait dans ces mécanismes de protection, soit le ginkgolide B et les flavonoïdes.

3.1.1 Effet de l'EGB 761 sur la fibrillation du peptide β -amyloïde et sur la mortalité/survie cellulaire.

Le β A est toxique lorsqu'il est sous sa forme fibrillaire et l'EGB 761 peut inhiber la formation des fibrilles lors du processus de vieillissement de ce peptide (Luo *et al.*, 2002). Nous avons étudié l'effet et l'implication des flavonoïdes et du ginkgolide B contenus dans cet extrait sur la fibrillation du β A₁₋₄₀. Le processus de vieillissement du β A₁₋₄₀, qui permet de faire passer le peptide de sa forme monomérique à sa forme fibrillaire, s'est déroulé en présence de l'EGB 761 (20 μ g/mL), du CP205 (fraction des flavonoïdes de l'EGB 761, 10 μ g/mL) ou du BN52021 (ginkgolide B, 10 μ g/mL). Nous avons ensuite visualisé l'état du β A₁₋₄₀ par microscopie électronique. Les résultats obtenus sont présentés à la **figure 5**. La **figure 5A** permet d'observer les fibrilles et agrégats de β A₁₋₄₀ (1 mg/mL, 236 μ M) suivant son vieillissement pendant 48 heures à 37 °C en solution aqueuse. Ces conditions de vieillissement sont celles généralement utilisées pour rendre toxique le peptide synthétique et en faire usage dans les expérimentations de cytotoxicité. Le rouge Congo, un inhibiteur de la fibrillation du β A, a été utilisé comme contrôle positif (**figure 5B**). Lorsque le β A₁₋₄₀ a été co-incubé avec l'EGB 761 (20 μ g/mL), nous avons observé l'inhibition complète de la fibrillation du peptide (**figure 5C**). La co-incubation du β A₁₋₄₀ avec le BN52021 (10 μ g/mL) lors du vieillissement n'a pas eu d'effet sur la fibrillation du peptide et les fibrilles obtenues étaient similaires à celles observées lorsque le β A a été vieilli seul (**figure 5D**). Par contre, le CP205 (10 μ g/mL) a complètement inhibé la fibrillation du β A₁₋₄₀ (**figure 2E**). L'ampleur de l'inhibition de la fibrillation est comparable à celle obtenue avec l'EGB 761 ou avec le rouge Congo.

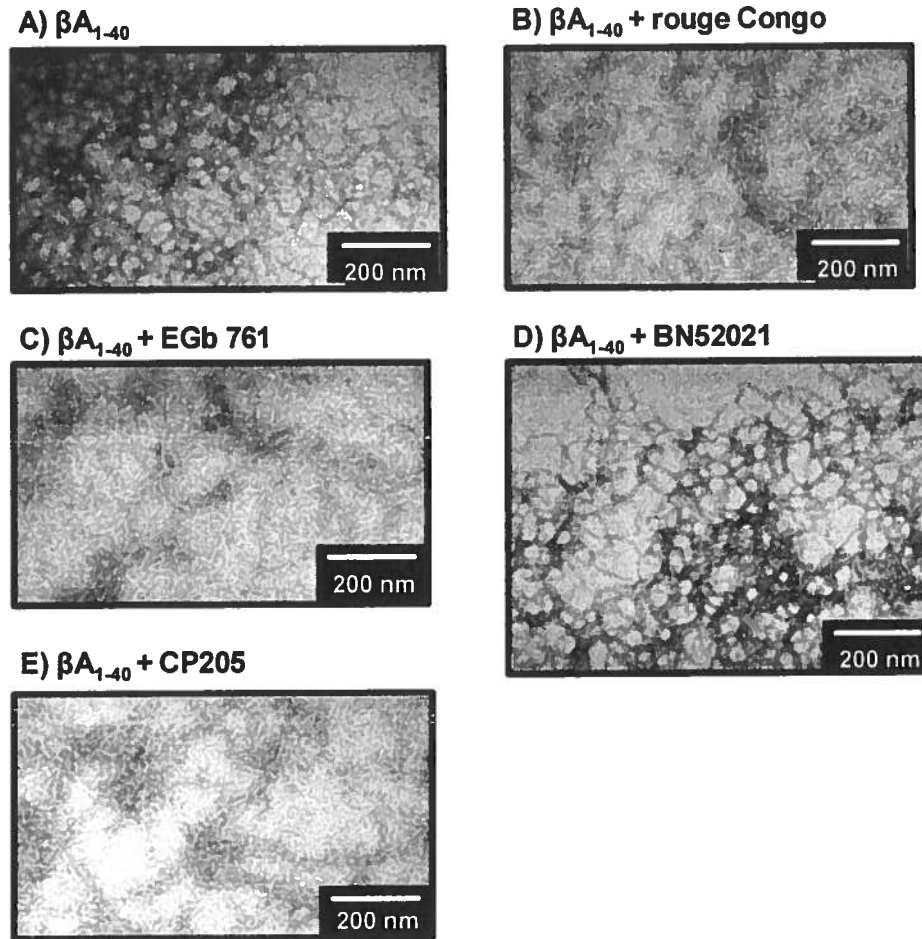


Figure 5. Observation par microscopie électronique du βA_{1-40} suivant le processus de vieillissement *in vitro*.

Le βA_{1-40} à 1 mg/mL (236 μM) a été incubé pendant 48 heures à 37 °C : A) seul, B) avec rouge Congo 5 μM , C) avec l'EGb 761 20 $\mu g/mL$, D) avec le BN52021 10 $\mu g/mL$ ou E) avec le CP205 10 $\mu g/mL$. Grossissement 110 kX.

Puisque le βA est toxique sous sa forme fibrillaire, nous avons vérifié l'effet de la co-incubation du βA_{1-40} avec l'EGb 761, le BN52021 ou le CP205 lors du vieillissement sur la mortalité et la survie des cellules N2a. À la **figure 6** sont présentés les résultats obtenus par le test de cytotoxicité LDH lorsque les cellules N2a ont été traitées avec les solutions de βA_{1-40} (200 $\mu g/mL$, 47 μM) dont le processus de vieillissement diffère par la présence de l'EGb 761, du BN52021 ou du CP205. La valeur 100 % est arbitrairement attribuée au témoin. La mortalité cellulaire est exprimée en pourcentage de LDH dans le milieu de culture comparativement au témoin. Le βA_{1-40} n'ayant pas subi de processus de vieillissement (βA_{1-40} NV) est utilisé comme contrôle positif et le βA_{1-40} ayant subi le processus de vieillissement (βA_{1-40} V) comme contrôle négatif. La **figure 6** montre qu'il

n'y a pas de différence significative entre le témoin ($100,0 \pm 5,3$ %) et le βA_{1-40} NV ($82,9 \pm 8,0$ %). Par contre, le traitement des cellules N2a avec le βA_{1-40} V entraîne une augmentation de la mortalité cellulaire ($136,9 \pm 32,3$ %) qui est significativement différente du témoin ($100,0 \pm 5,3$ %). Lorsque le βA_{1-40} a été co-incubé avec l'EGb 761 ($75,2 \pm 4,3$ %), le CP205 ($67,8 \pm 6,3$ %) ou le BN52021 ($85,4 \pm 2,5$ %) lors du processus de vieillissement, il y a diminution significative de la mortalité cellulaire comparativement aux cellules N2a traitées avec le βA_{1-40} V seulement ($137,0 \pm 32,4$ %). En fait, le signal obtenu est comparable à celui obtenu avec le βA_{1-40} NV ($82,9 \pm 8,0$ %). La diminution de la cytotoxicité du βA_{1-40} lorsque celui-ci est «vieilli» en co-incubation avec le BN52021 est étonnante puisque le BN52021 ne semble pas inhiber la fibrillation du βA_{1-40} (figure 5D).

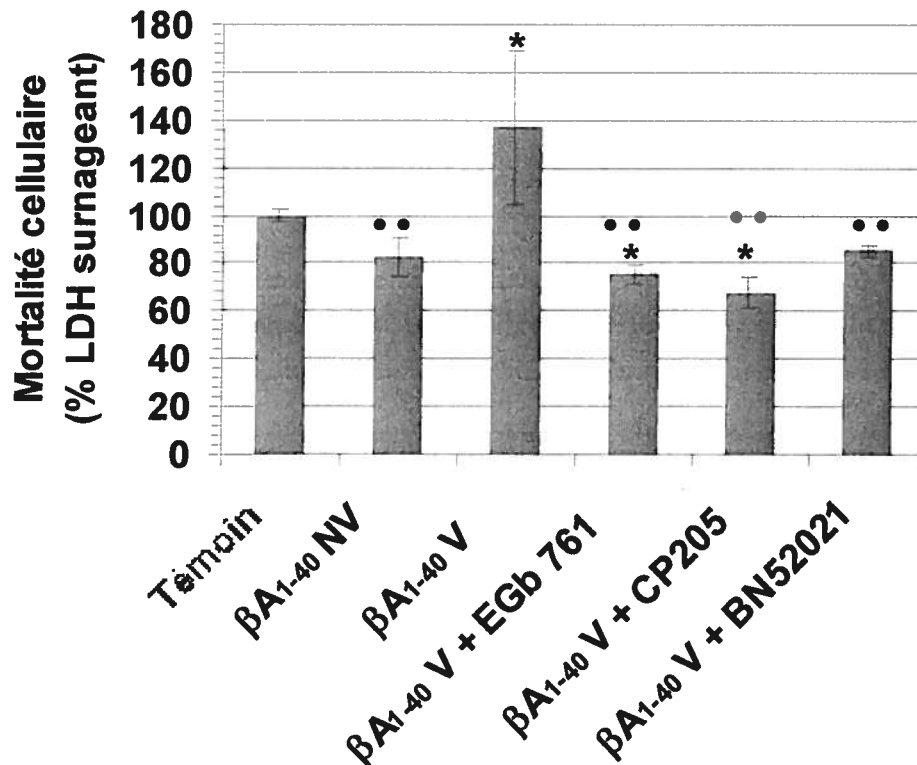


Figure 6. Effet de la co-incubation du βA_{1-40} avec l'EGb 761, le CP205, ou le BN52021 lors du processus de vieillissement sur la mortalité des cellules N2a. Les cellules ont été traitées 24 heures avec βA_{1-40} à 200 $\mu\text{g/mL}$ (47 μM). La mortalité cellulaire a été détectée par le test LDH. NV=non «vieilli», V=«vieilli». Moyenne $\pm$ SEM (n=2). Significativement différent du: témoin (* $P < 0,05$), βA_{1-40} F (• $P < 0,01$).

Nous avons utilisé le test de survie cellulaire XTT pour confirmer les résultats obtenus par le test de cytotoxicité LDH. La valeur 100 % est attribuée arbitrairement au témoin. Les résultats présentés à la **figure 7** permettent de constater que la survie des cellules N2a traitées avec le βA_{1-40} NV ($92,8 \pm 1,0$ %) est significativement inférieure à celle du témoin ($100,0 \pm 1,9$ %), toxicité qui n'est pas observée par le test LDH (**figure 6**). La survie des cellules N2a traitées avec le βA_{1-40} V ($86,3 \pm 1,7$ %) est significativement inférieure à la survie des cellules du témoin et mais également à la survie des cellules traitées avec le βA_{1-40} NV ($92,8 \pm 1,0$ %). Comme observé par le test LDH, la co-incubation du βA_{1-40} avec l'EGb 761 à 20 $\mu\text{g/mL}$, le CP205 à 10 $\mu\text{g/mL}$ ou le BN52021 à 10 $\mu\text{g/mL}$ lors du vieillissement entraîne une augmentation de la survie des cellules N2a ($95,2 \pm 0,7$ %; $92,5 \pm 1,5$ % et $93,0 \pm 3,7$ % respectivement) comparativement aux cellules traitées avec le βA_{1-40} V ($86,3 \pm 1,7$ %). Le résultat obtenu lorsque le βA_{1-40} a été «vieilli» avec le BN52021 à 10 $\mu\text{g/mL}$ est étonnant puisque les cellules N2a sont protégées de la toxicité du βA_{1-40} alors que le BN52021 n'a pas d'effet inhibiteur sur la fibrillation du βA_{1-40} (**figure 5D**). D'autres mécanismes de protection par le BN52021 contre la toxicité du βA peuvent être impliqués.

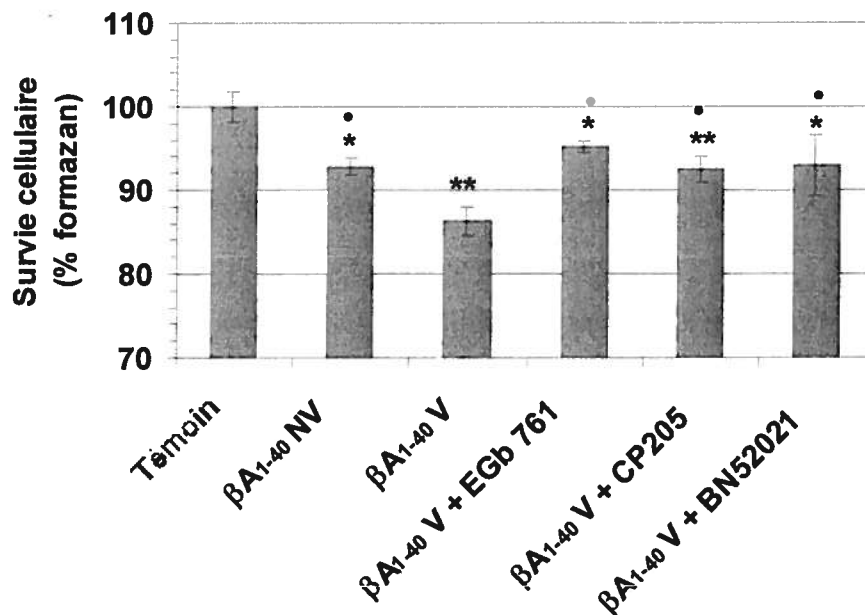


Figure 7. Effet de la co-incubation du βA_{1-40} avec l'EGb 761, le CP205 ou le BN52021 lors du processus de vieillissement sur la survie des cellules N2a.

Les cellules ont été traitées 24 heures avec βA_{1-40} à 200 $\mu\text{g/mL}$ (47 μM). La survie cellulaire a été mesurée par le test XTT. NV=non «vieilli», V=«vieilli». Moyenne $\pm$ SEM (n=2). Significativement différent du : témoin (** $P < 0,01$; * $P < 0,05$), βA_{1-40} V (· $P < 0,05$).

Nous nous sommes également intéressés à l'effet de la co-incubation du βA_{25-35} avec l'EGb 761, le BN52021 ou le CP205 lors du processus de vieillissement sur la mortalité et la survie des cellules N2a. Le βA_{25-35} ne se retrouve pas dans le cerveau des patients atteints de la MA mais puisque sa toxicité est similaire au βA_{1-40} ou au βA_{1-42} , il est largement utilisé dans la recherche sur la MA (Yankner, Duffy et Kirschner, 1990). La **figure 8** présente les résultats obtenus par le test de cytotoxicité LDH chez les cellules N2a traitées avec des solutions de βA_{25-35} (200 $\mu\text{g/mL}$, 188 μM) dont le processus de vieillissement diffère par la présence de l'EGb 761, du BN52021 ou du CP205. La mortalité cellulaire est exprimée en pourcentage comparativement au témoin ($100,0 \pm 5,3$ %). D'abord, il est intéressant de constater que la mortalité cellulaire est similaire pour les cellules traitées avec le βA_{25-35} n'ayant pas subi de processus de vieillissement (βA_{25-35} NV, $242,4 \pm 44,5$ %) et pour les cellules traitées avec le βA_{25-35} ayant subi un processus de vieillissement (βA_{25-35} V, $259,4 \pm 30,0$ %). Par ailleurs, la seule protection observée est lors du vieillissement de βA_{25-35} avec l'EGb 761 ($100,3 \pm 12,0$ %). Le BN52021 ($169,4 \pm 34,8$ %) et le CP205 ($166,0 \pm 20,1$ %) n'ont pas eu d'effet protecteur lorsque le βA_{25-35} a été co-incubé avec ces substances lors du processus de vieillissement.

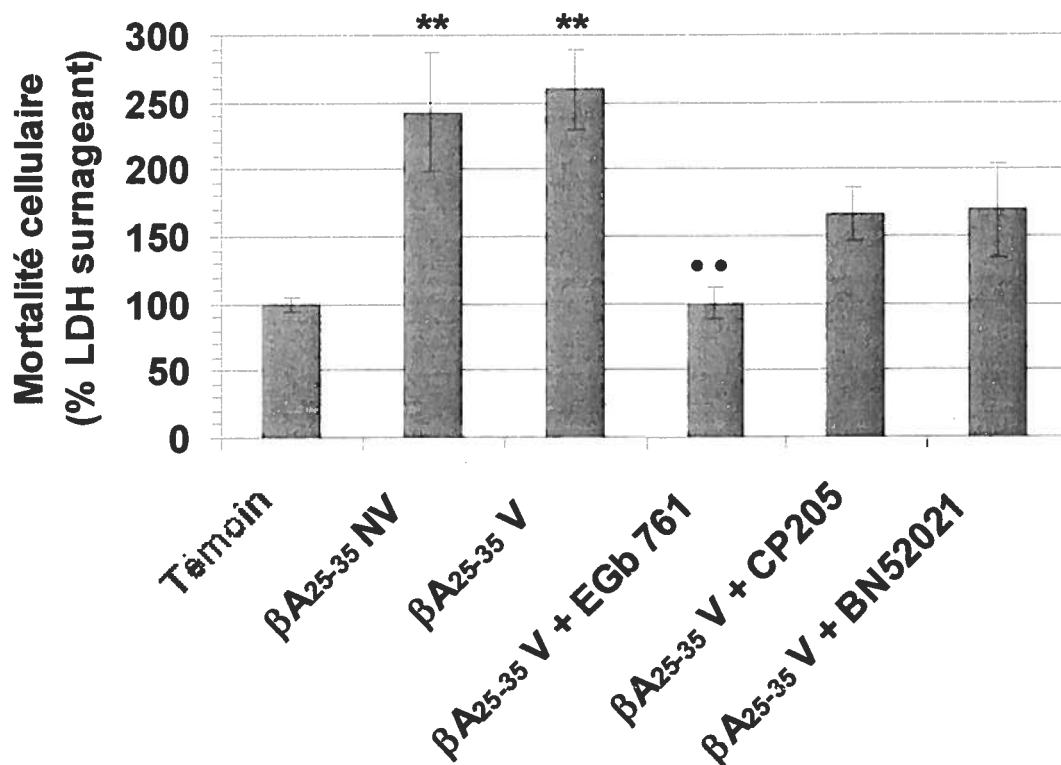


Figure 8. Effet de la co-incubation du βA_{25-35} avec l'EGb 761, le CP205 ou le BN52021 lors du processus de vieillissement sur la mortalité des cellules N2a. Les cellules ont été traitées 24 heures avec βA_{25-35} à 200 $\mu\text{g/mL}$ (188 μM). La mortalité cellulaire a été mesurée par le test LDH. NV=non «vieilli», V=«vieilli». Moyenne $\pm$ SEM (n=8). Significativement différent du : témoin (** $P < 0,01$), βA_{25-35} V (•• $P < 0,01$).

Les résultats obtenus par le test XTT, lorsque les cellules N2a ont été traitées avec les différentes solutions de βA_{25-35} (200 $\mu\text{g/mL}$, 188 μM), ne concordent pas tous avec les résultats obtenus par le test LDH. La **figure 9** montre que le βA_{25-35} NV ($95,0 \pm 2,4$ % de survie) n'est pas toxique (témoin = $100,0 \pm 1,9$ %), contrairement aux résultats du test LDH (**figure 8**). La toxicité du βA_{25-35} V observée par le test LDH est confirmée par le test XTT ($90,4 \pm 2,5$ % de survie). Tout comme par le test LDH, le test de survie cellulaire XTT permet de démontrer que la co-incubation du βA_{25-35} avec l'EGb 761 ($102,2 \pm 2,3$ % de survie) lors du vieillissement protège les cellules de la toxicité du βA_{25-35} . Mais, contrairement au test LDH, le test XTT nous permet également de détecter une protection par le BN52021 ($98,6 \pm 2,5$ % de survie) et le CP205 ($101,0 \pm 1,3$ %) lors du vieillissement du βA_{25-35} avec ces substances. Il faut mentionner que le test de

cytotoxicité LDH est une mesure indirecte de l'intégrité de la membrane cellulaire alors que le test de survie XTT mesure l'activité mitochondriale. Il peut donc y avoir certaines différences entre les résultats obtenus avec les deux tests.

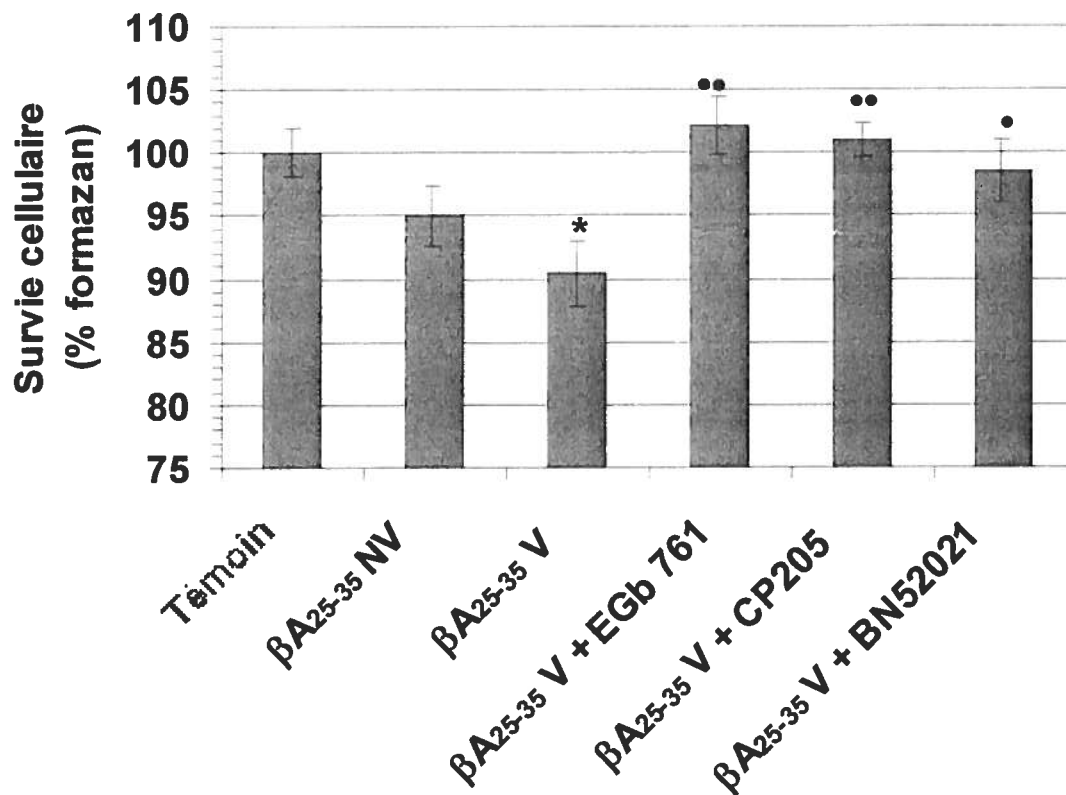


Figure 9. Effet de la co-incubation du βA_{25-35} avec l'EGb 761, le CP205 ou le BN52021 lors du processus de vieillissement sur la survie des cellules N2a. Les cellules ont été traitées 24 heures avec βA_{25-35} à 200 $\mu\text{g/mL}$ (188 μM). La survie des cellules a été mesurée par le test XTT. NV=non «vieilli», V=«vieilli». Moyenne $\pm$ SEM (n=8). Significativement différent du : témoin (* $P<0,05$), βA_{25-35} V (** $P<0,01$; • $P<0,05$).

3.1.2 Modulation du facteur de transcription nucléaire κB par l'EGb 761, le BN52021 et le CP205 dans la protection contre la toxicité du βA .

L'EGb 761 est un antioxydant reconnu (Bastianetto *et al.*, 2000; Bastianetto et Quirion, 2002; Smith et Luo, 2003). Nous nous sommes intéressés à la modulation du NF- κB par cet extrait standardisé parce que ce facteur de transcription nucléaire est sensible au potentiel rédox intracellulaire (Behl *et al.*, 1994; Das, Lewis-Molock et White, 1995). L'EGb 761 pourrait, par son pouvoir antioxydant, modifier l'activité du NF- κB .

Cette modification pourrait être associée à la protection contre la toxicité du β A. Nous avons étudié la modulation du NF- κ B par l'Egb 761 en déterminant la distribution de p50, p65 et I κ B β dans les fractions cytoplasmique et nucléaire des cellules N2a par immunobuvardage. Il faut rappeler ici que l'activation du NF- κ B se traduit par la phosphorylation et la destruction de l'I κ B β par le protéasome ce qui libère le p50 et le p65 qui peuvent passer du cytoplasme des cellules vers le noyau. Les anticorps utilisés reconnaissent p50 et p65 libres, c'est-à-dire qui ne sont pas liés à l'I κ B β (épitope reconnu par l'anti-p50 : SDLETSEPKPFLYYPEIKDK; épitope reconnu par l'anti-p65 : EDFSSIADMDFSALLSQISS). D'abord, nous avons contrôlé la séparation des protéines cytoplasmiques et nucléaires. L'anticorps anti-I κ B β a été utilisé pour détecter la protéine I κ B β présente seulement dans le cytoplasme des cellules. Les anticorps anti-NeuN et anti-HDAC1 ont été utilisés pour détecter les protéines NeuN et HDAC qui se trouvent exclusivement dans le noyau des cellules. Notons que la protéine NeuN est présente seulement dans les neurones. Confirmant la séparation efficace des protéines, le film obtenu suivant l'immonobuvardage (**figure 10**) montre que l'I κ B β est présente seulement dans les échantillons de protéines cytoplasmiques. Comme nous nous y attendions, NeuN et l'HADC1 se trouvent seulement dans les échantillons de protéines nucléaires. De plus, la détection de NeuN dans les fractions nucléaires confirme la nature neuronale de la lignée cellulaire utilisée (N2a).

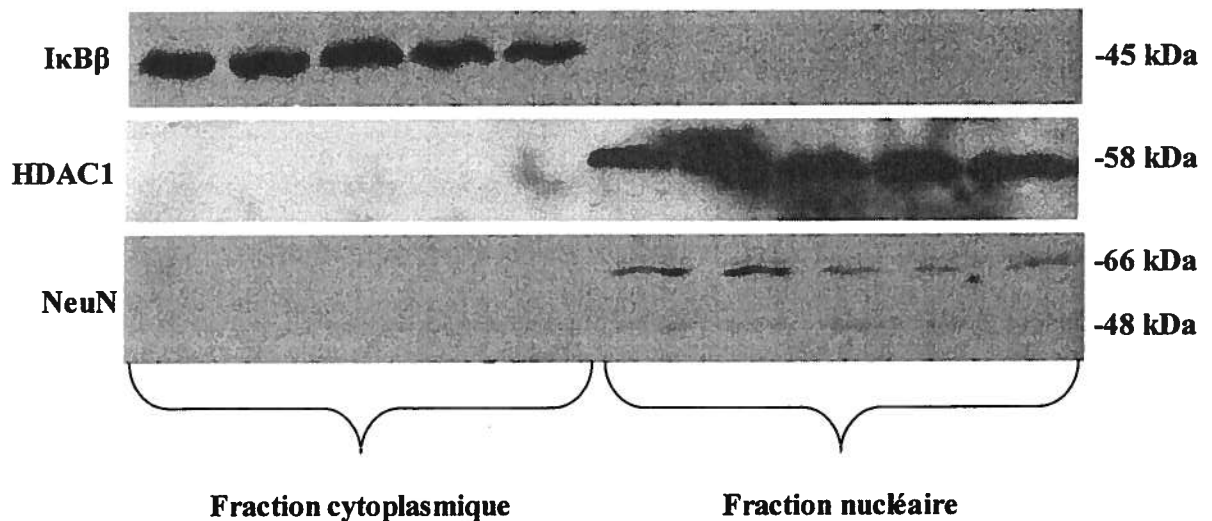


Figure 10. Contrôle de la séparation des protéines cytoplasmiques et nucléaires. Les protéines ont été extraites de cellules N2a avec le kit d'extraction nucléaire Active Motif. Détection par immunobuvardage de la protéine cytoplasmique I κ B β (45 kDa) et des protéines nucléaires HDAC1 (58 kDa) et NeuN (48 kDa et 66 kDa).

Nous avons ensuite étudié l'effet-dose de l'EGB 761 sur l'activité du NF- κ B. Les cellules N2a avec différentes concentrations d'EGB 761, soit 5, 20, 50 et 100 μ g/mL. Une étude par Kemler et Fontana (1999) a montré que la cinétique d'activation du NF- κ B par le TNF- α est biphasique. Le TNF- α entraîne une augmentation de la liaison du NF- κ B à l'ADN après 30 minutes de traitement, ce qui est associée à la dégradation rapide de la sous-unité inhibitrice I κ B. Après une heure de traitement, la liaison du NF- κ B à l'ADN diminue et est associée à la resynthèse de l'I κ B. Finalement, il y a reprise de l'activation du NF- κ B après 2 heures de traitement et celle-ci demeure constante jusqu'à 4 heures de traitement. Selon la cinétique d'activation du NF- κ B présentée par cette étude, nous avons choisi de faire des traitements de 30 minutes pour observer l'activation initiale du NF- κ B. Les résultats obtenus pour p50 et p65 cytoplasmiques ainsi que pour l'I κ B β sont présentés à la **figure 11** et sont exprimés en pourcentage de l'intensité du signal témoin. D'abord, il n'y a pas de changement significatif dans les niveaux de p50 et de p65 cytoplasmiques, indépendamment de la concentration de l'EGB 761 utilisée. Pour ce qui est d'I κ B β , le niveau reste inchangé lorsque les cellules sont traitées avec 5 et 20 μ g/mL de l'EGB 761 ($99,1 \pm 9,9$ % et $99,7 \pm 3,4$ %, respectivement). Par contre, le traitement des cellules N2a avec l'EGB 761 à 50 et 100 μ g/mL entraîne une diminution significative des niveaux d'I κ B β dans le cytoplasme des cellules N2a ($83,0 \pm 4,7$ % et $77,8 \pm 7,3$ %, respectivement). Il y a deux hypothèses pouvant expliquer la diminution du niveau d'I κ B β . D'une part, l'EGB 761 pourrait diminuer l'activation du NF- κ B. La séquence κ B se retrouvant sur le gène de l'I κ B β , une diminution de l'activation de ce facteur de transcription peut provoquer la réduction de la synthèse de l'I κ B β . D'autre part, ces résultats pourraient aussi s'expliquer par l'activation du NF- κ B qui entraîne la phosphorylation et la dégradation de l'I κ B β . La dégradation de l'I κ B β entraînant la libération de p50 et p65, ces sous-unités peuvent passer dans le noyau des cellules. Le fait que nous n'observions pas la diminution de p50 et de p65 dans le cytoplasme des cellules n'exclut pas la possibilité qu'il y ait activation du NF- κ B. La séquence - κ B se retrouvant sur le promoteur du gène de la protéine p105 (précurseur de p50), l'activation du NF- κ B entraîne la resynthèse de p50.

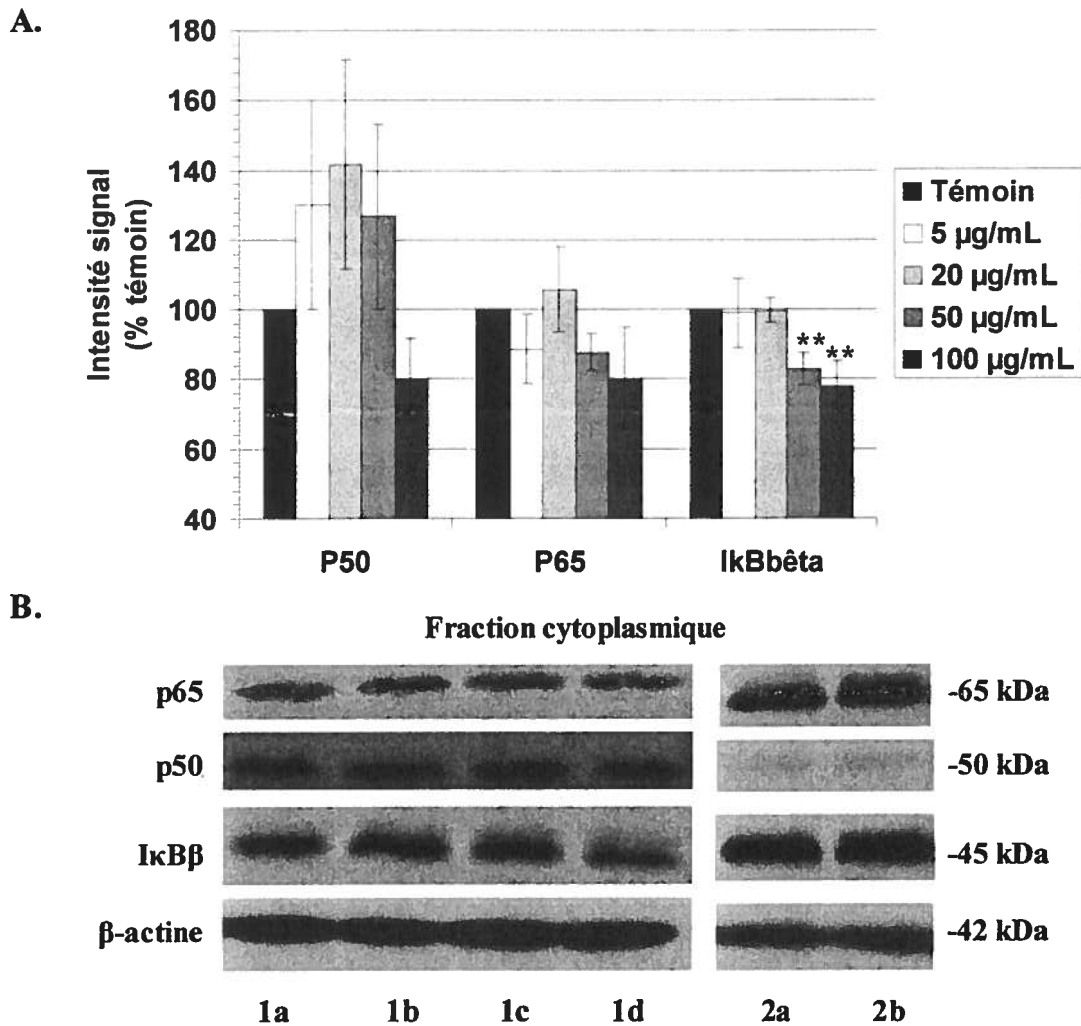


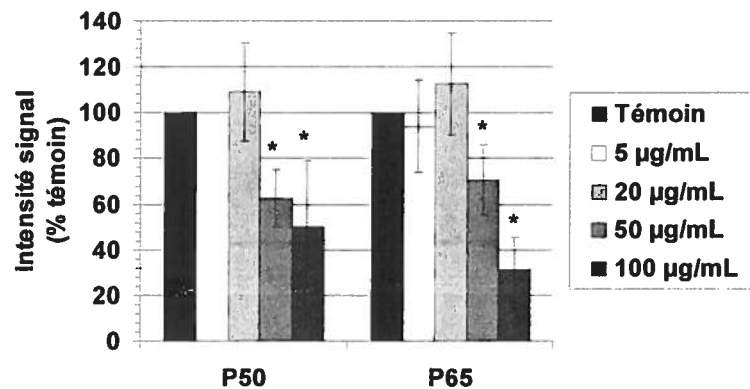
Figure 11. Effet-dose de l'EGb 761 sur l'activité du NF-κB (fraction cytoplasmique). Cellules N2a traitées 30 minutes avec l'EGb 761. Immunobuvardage NF-κB.

- A.** Niveaux cytoplasmiques de p50, p65 et IκBβ exprimés par l'intensité du signal en % du témoin. Moyenne $\pm$ SEM (n=3). Significativement différent du témoin (** P<0,01).
- B.** p50 (50 kDa), p65 (65 kDa) et IκBβ (45 kDa) dans la fraction cytoplasmique; bandes utilisées pour la quantification présentée en A : 1a-Témoin; 1b-EGb 761 5 µg/mL; 1c-EGb 761 50 µg/mL; 1d-EGb 761 100 µg/mL; 2a-Témoin et 2b-EGb 761 20 µg/mL. Les membranes ont été décapées et incubées avec un anticorps monoclonal anti-β-actine (42 kDa) pour contrôler la quantité de protéines déposée sur les gels.

Pour déterminer si l'EGb 761 active ou inhibe le NF-κB, nous avons analysé par immunobuvardage les niveaux de p50 et p65 dans la fraction nucléaire des cellules N2a (**figure 12**). En utilisant 5 et 20 µg/mL d'EGb 761, aucune variation significative du niveau nucléaire de p50 et p65 a été observée (p50: 5 µg/mL = 100 ± 0 %, 20 µg/mL = $109,1 \pm 21,5$ %; p65 : 5 µg/mL = $93,9 \pm 20,2$ %, 20 µg/mL = $112,7 \pm 22,4$ %). Notons

qu'à ces concentrations, il n'y a pas de variation du niveau de l'I κ B β (**figure 11**). Par contre, avec l'EGb 761 à 50 et 100 μ g/mL, il y a une diminution significative du niveau nucléaire de p50 et p65 (p50 : 50 μ g/mL = $62,5 \pm 12,5$ %, 100 μ g/mL = $50 \pm 28,9$ %; p65 : 50 μ g/mL = $70,6 \pm 15,3$ %, 100 μ g/mL = $31,2 \pm 14,2$ %). Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle l'EGb 761 inhibe l'activité du NF- κ B, ce qui s'observe par une diminution de p50 et de p65 dans la fraction nucléaire. Ainsi, la diminution de l'I κ B β serait attribuable à la réduction de sa synthèse.

A.



B.

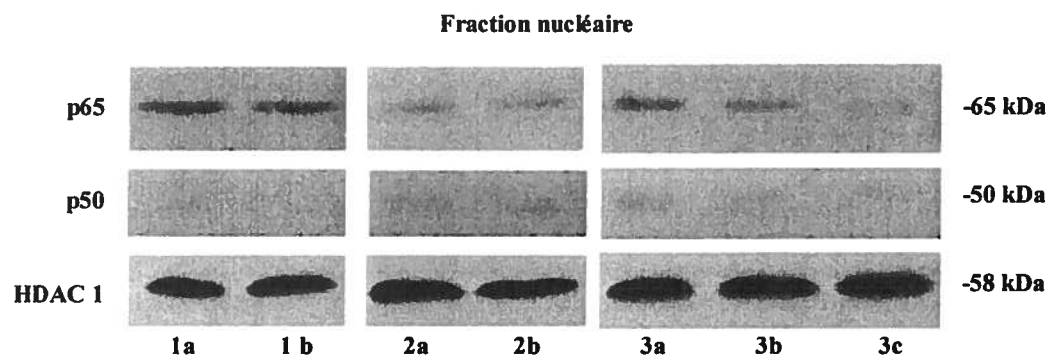


Figure 12. Effet-dose de l'EGb 761 sur l'activité du NF- κ B (fraction nucléaire).

Cellules N2a traitées 30 minutes avec l'EGb 761. Immunobuvardage NF- κ B.

- A. Niveaux nucléaires de p50 et p65 exprimés par l'intensité du signal en % du témoin. Moyenne $\pm$ SEM (n=3). Significativement différent du témoin (* P<0,05).
- B. p50 (50 kDa) et p65 (65 kDa) dans la fraction nucléaire; bandes utilisées pour la quantification présentée en A : 1a-Témoin; 1b-EGb 761 5 μ g/mL; 2a-Témoin; 2b-EGb 761 20 μ g/mL; 3a-Témoin; 3b-EGb 761 50 μ g/mL; 3c-EGb 761 100 μ g/mL. Les membranes ont été décapées et incubées avec un anticorps monoclonal anti-HDAC1 (58 kDa) pour contrôler la quantité de protéines déposée sur les gels.

Pour renforcer l'hypothèse selon laquelle l'EGb 761 diminue l'activité du NF- κ B, nous avons étudié la capacité de cet extrait à diminuer l'activité du NF- κ B induite par la

cycloheximide. Ce composé, un inhibiteur de la synthèse des protéines, augmente l'activité du NF- κ B car il empêche notamment la synthèse de la protéine inhibitrice I κ B (Sen et Baltimore, 1986). Les cellules N2a ont été traitées 2 heures avec la cycloheximide suivi d'un traitement de 15 minutes avec l'EGb 761 à 50 et 100 μ g/mL. p50 et p65 ont été détectés par immunobuvardage. Les résultats obtenus sont présentés à la **figure 13**. L'activation du NF- κ B par la cycloheximide est démontrée par une augmentation importante des niveaux nucléaires de p50 et p65 (2 200,0 % et 933,3 % respectivement) comparativement au témoin. L'EGb 761, à 50 et 100 μ g/mL, entraîne une diminution des niveaux nucléaires de p50 et p65 (p50 : 50 μ g/mL = 33,3 %, 100 μ g/mL = 33,3 %; p65 : 50 et 100 μ g/mL = niveaux non détectables par l'appareil MultiImager), confirmant les résultats présentés à la **figure 12**. Lorsque les cellules N2a sont traitées avec la cycloheximide et l'EGb 761 à 50 μ g/mL, il n'y a une légère augmentation de p65 nucléaire (2 300 %) mais une diminution de p50 nucléaire (700 %) comparativement aux cellules traitées seulement avec la cycloheximide (p65 = 2 200,0 %; p50 = 933,3 %). Lorsque les cellules N2a sont traitées avec la cycloheximide et l'EGb 761 à 100 μ g/mL, il y a diminution des niveaux nucléaires de p50 et de p65 (600,0 % et 1 900,0 %, respectivement) comparativement aux cellules traitées seulement avec la cycloheximide (p65 = 2 200,0 %; p50 = 933,3 %). Les résultats présentés aux **figures 12 et 13** démontrent que l'EGb 761 a un effet inhibiteur sur l'activité du NF- κ B.

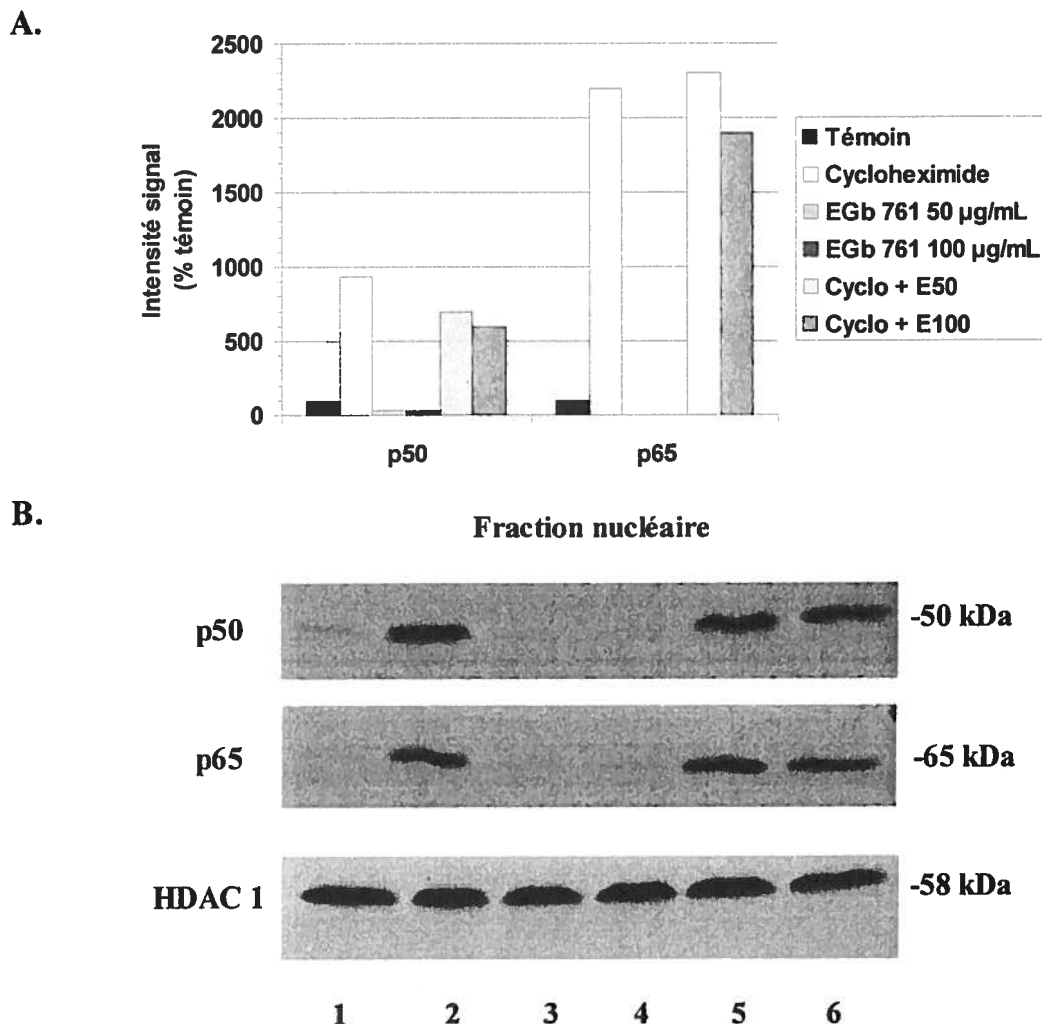


Figure 13. Effet inhibiteur de l'EGb 761 sur l'activation du NF- κ B induite par la cycloheximide (fraction nucléaire).

Cellules N2a traitées 2 heures avec la cycloheximide suivi d'un traitement de 15 minutes avec l'EGb 761. Immunobuvardage NF- κ B.

- A.** Niveaux nucléaires de p50 et p65 exprimés par l'intensité du signal en % du témoin (n=1).
B. p50 (50 kDa) et p65 (65 kDa) dans la fraction nucléaire : 1-Témoin; 2-cycloheximide 25 µg/mL; 3-EGb 761 50 µg/mL; 4-EGb 761 100 µg/mL; 5-Cycloheximide 25 µg/mL + EGb 761 50 µg/mL et 6-cycloheximide 25 µg/mL + EGb 761 100 µg/mL. La membrane a été décapée et incubée avec un anticorps monoclonal anti-HDAC1 (58 kDa) pour contrôler la quantité de protéines déposée sur le gel.

L'EGb 761 est composé de plusieurs molécules et nous nous sommes intéressés au rôle de certaines d'entre elles dans l'inhibition de l'activité du NF- κ B. Les résultats présentés à la section 3.1.1 ont démontré que le ginkgolide B (BN52021) protège de la toxicité du β A mais il ne s'agit pas d'un mécanisme anti-fibrillaire. Dans le cas des flavonoïdes de l'EGb 761 (CP205), se sont des antioxydants qui protègent de la toxicité

du β A (Bastianetto et Quirion, 2002) et nous savons que le NF- κ B est régulé par le potentiel rédox intracellulaire (Behl *et al.*, 1994). Ces informations nous ont amené à étudier le rôle des flavonoïdes (CP205) et du ginkgolide B (BN52021) dans l'inhibition de l'activité du NF- κ B par l'Egb 761. Les cellules N2a ont été traitées avec le CP205 à 10 μ g/mL ou le BN52021 à 10 μ g/mL pendant 30 minutes. Ces concentrations ont été choisies considérant que l'Egb 761 contient 24 % de flavonoïdes et 6 % de terpénoïdes. Elles correspondent à 10-20 % des concentrations d'Egb 761 (50-100 μ g/mL) ayant eu un effet sur le NF- κ B. L'Egb 761 à 50 et 100 μ g/mL est utilisé comme contrôle positif. Le p65 et l'I κ B β ont été détectés par immunobuvardage (**figure 14**). À l'instar de l'Egb 761, le BN52021 et le CP205 n'ont pas d'effet sur le niveau de p65 cytoplasmique. Également, il y a dégradation de l'I κ B β , autant lorsque les cellules sont traitées avec le BN52021 ($82,8 \pm 7,1$ % du témoin) que lorsqu'elles sont traitées avec le CP205 ($89,4 \pm 5,8$ % du témoin). La dégradation de l'I κ B β est similaire à celle observée avec l'Egb 761 à 50 et 100 μ g/mL ($86,3 \pm 4,1$ % et $77,8 \pm 7,3$ %, respectivement). Ce qui est différent, c'est l'augmentation significative de p65 nucléaire lorsque les cellules sont traitées avec le BN52021 ($132,6 \pm 18,6$ %) et le CP205 ($185,3 \pm 26,8$ %) comparativement aux traitements avec l'Egb 761 à 50 et 100 μ g/mL qui entraîne une diminution de p65 nucléaire ($56,5 \pm 18,5$ % et $31,2 \pm 14,2$ %, respectivement). Il semble donc que le BN52021 et le CP205 entraînent l'activation du NF- κ B. Sachant que l'Egb 761 réduit l'activité du NF- κ B, d'autres composantes de cet extrait doivent avoir des effets compensatoires pour conférer à cet extrait son effet inhibiteur. La synergie des composantes de l'Egb 761 est donc importante dans l'effet inhibiteur de cet extrait sur le NF- κ B.

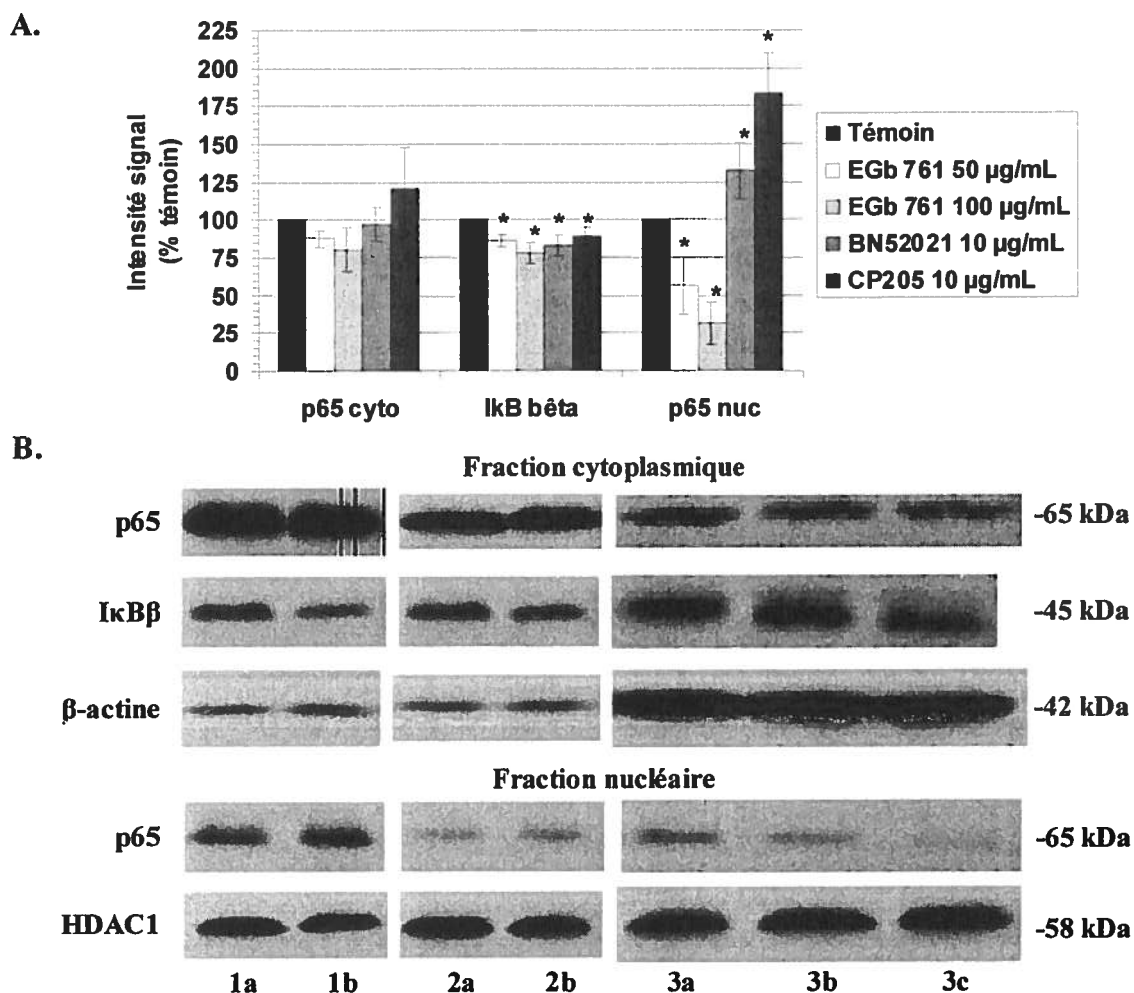


Figure 14. Modulation du NF-κB par le CP205 et le BN52021.

Cellules N2a traitées 30 minutes avec le CP205 et le BN52021 (contrôle positif → EGb 761). Immunobuvardage NF-κB.

- A.** Niveaux cytoplasmiques de p65 et IκBβ et niveau nucléaire de p65 exprimés par l'intensité du signal en % du témoin. Moyenne ± SEM (n=5). Significativement différent du témoin (* P<0,05).
- B.** p65 (65 kDa) et IκBβ (45 kDa) dans la fraction cytoplasmique et p65 dans la fraction nucléaire: 1a-Témoin; 1b-BN52021 10 µg/mL; 2a-Témoin; 2b-CP205 10 µg/mL; 3a-Témoin; 3b-EGb 761 50 µg/mL; 3c-EGb 761 100 µg/mL. Les membranes ont été décapées et incubées avec un anticorps monoclonal anti-β-actine (42 kDa) dans le cas de la fraction cytoplasmique et anti-HDAC1 (58 kDa) dans le cas de la fraction nucléaire pour contrôler la quantité de protéines déposée sur le gel.

L'inhibition de l'activité du NF-κB par l'EGb 761 pourrait expliquer sa capacité à protéger les cellules neuronales de la toxicité du βA. Nous avons d'abord déterminé la courbe effet-dose du βA₂₅₋₃₅ avec le test de survie cellulaire XTT. Les résultats obtenus sont présentés à la **figure 15**. Avec βA₂₅₋₃₅ à 0,1 (101,0 ± 1,4 %), 1 (94,4 ± 3,9 %) ou 10 µg/mL (94,6 ± 2,7 %), il n'y a pas de différence significative dans la survie des cellules

comparativement au témoin ($100,0 \pm 2,0$ %). À 100 et 150 $\mu\text{g/mL}$ de βA_{25-35} , la survie des cellules est diminuée à $89,0 \pm 2,2$ et $85,3 \pm 3,6$ % respectivement.

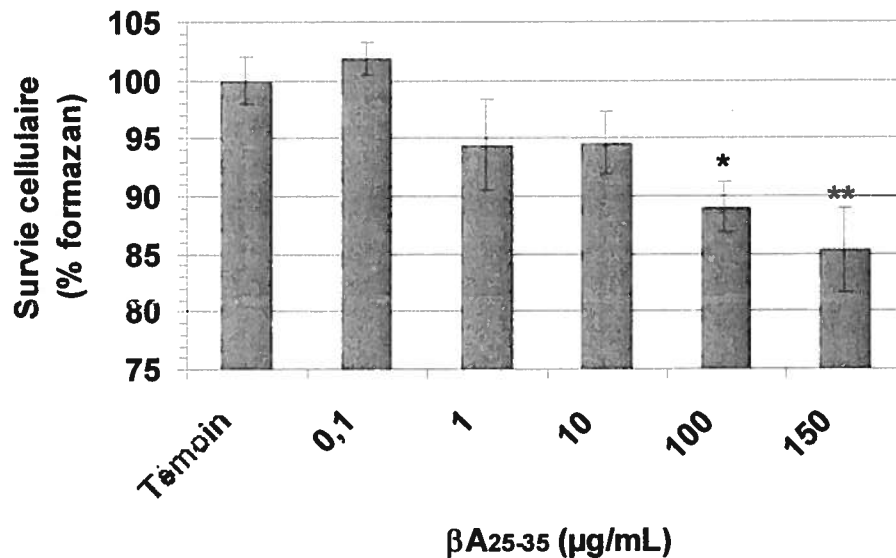


Figure 15. Effet-dose du βA_{25-35} sur la survie des cellules N2a.

Les cellules ont été traitées avec le βA_{25-35} pendant 24 heures. Les valeurs expriment la moyenne $\pm$ SEM de 2 expérimentations séparées, chacune répétée en triplicata. Significativement différent du témoin (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

Ensuite, les cellules N2a ont été traitées 30 minutes avec l'EGb 761 et le βA_{25-35} à 100 $\mu\text{g/mL}$. Le p65 et l'I κ B β ont été détectés dans les fractions cytoplasmique et nucléaire par immunobuvardage. Les résultats sont présentés à la **figure 16**. À 100 $\mu\text{g/mL}$ (94,3 μM), le βA_{25-35} n'a pas d'effet sur la modulation du NF- κ B puisque les niveaux de p65 et I κ B β ne sont pas significativement différents des niveaux des témoins. Ces résultats sont en accords avec ceux présentés par Kaltschmidt *et al.* (1997) qui ont démontré que le βA_{25-35} , à plus de 10 μM , n'a pas d'effet sur l'activité du NF- κ B et entraîne la mort neuronale. Ensuite, tel que présenté précédemment, l'EGb 761 à 50 $\mu\text{g/mL}$ réduit significativement les niveaux de l'I κ B β ($83,0 \pm 4,7$ %) et de p65 nucléaire ($70,6 \pm 15,3$ %). Ce qui est particulièrement intéressant ici, c'est la réduction très importante du niveau de p65 nucléaire lorsque les cellules sont co-traitées avec l'EGb 761 à 50 $\mu\text{g/mL}$ et le βA_{25-35} à 100 $\mu\text{g/mL}$ ($16,7 \pm 0$ %), comparativement au témoin et au traitement avec le βA_{25-35} à 100 $\mu\text{g/mL}$ seul ($124,0 \pm 18,8$ %). L'amyloïde induirait un mécanisme de compensation, une réduction de l'activité du NF- κ B par l'EGb 761 encore plus importante que lorsque

l'extrait est utilisé seul, qui protégerait les cellules de sa toxicité. Selon ces résultats, la réduction de l'activité du NF- κ B en présence de l'EGb 761 et du β A₂₅₋₃₅ serait un mécanisme protecteur.

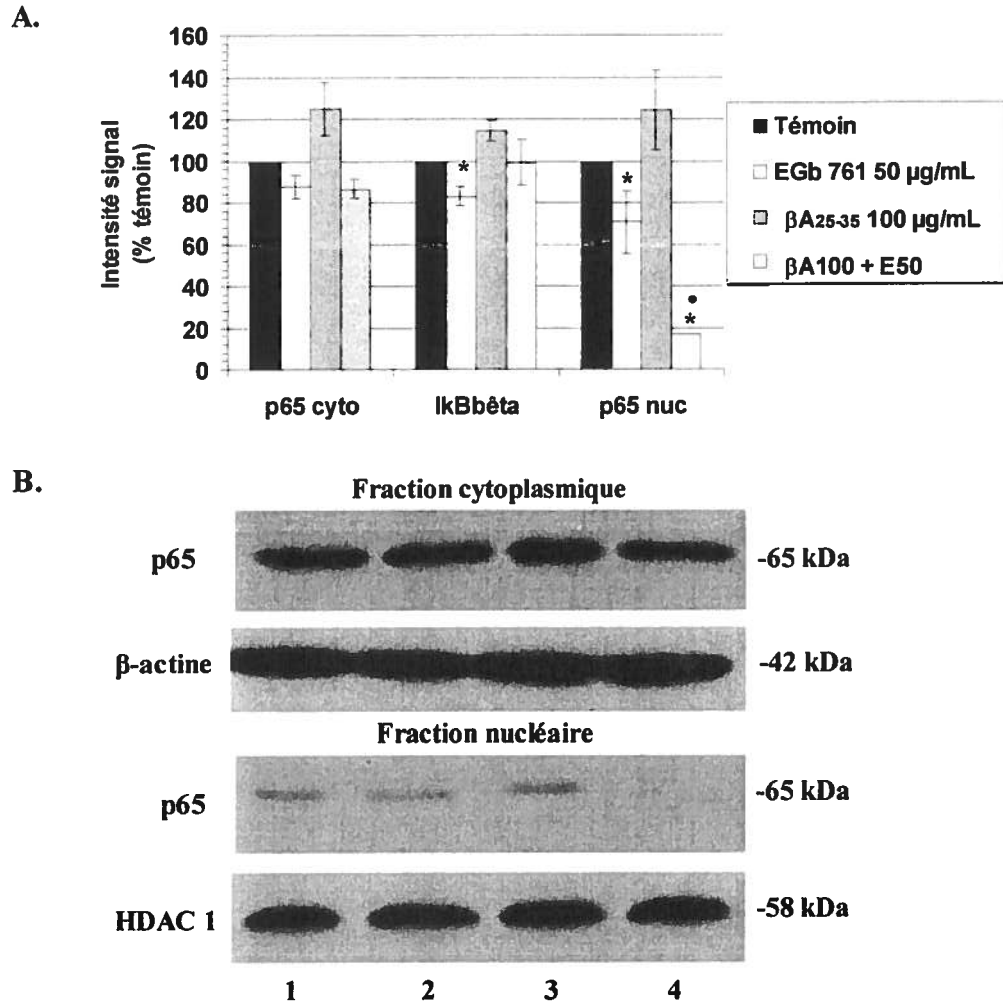


Figure 16. Modulation du NF- κ B par l'EGb 761 et/ou β A₂₅₋₃₅.
Cellules N2a traitées 30 minutes avec l'EGb 761 50 à μ g/mL et/ou β A₂₅₋₃₅ à 100 μ g/mL (94,3 μ M). Immunobuvardage NF- κ B.

- A.** Niveaux cytoplasmiques de p65 et I κ B β et niveau nucléaire de p65 exprimés par l'intensité du signal en % du témoin. Moyenne $\pm$ SEM (n=2). Significativement différent du: témoin (* P<0,05), β A₂₅₋₃₅ 100 μ g/mL (*P<0,05).
- B.** p65 (65 kDa) dans les fractions cytoplasmique et nucléaire: 1-Témoin; 2-EGb 761 50 μ g/mL; 3- β A₂₅₋₃₅ 100 μ g/mL et 4-EGb 761 50 μ g/mL + β A₂₅₋₃₅ 100 μ g/mL. Les membranes ont été découpées et incubées avec un anticorps monoclonal anti- β -actine (42 kDa) dans le cas de la fraction cytoplasmique et anti-HDAC1 (58 kDa) dans le cas de la fraction nucléaire pour contrôler la quantité de protéines déposée sur le gel.

3.2 Potentiel neuroprotecteur et mécanismes de protection du tyrosol et de l'hydroxytyrosol contre la toxicité du peptide β -amyloïde.

Une étude épidémiologique suggère que la diète méditerranéenne protègerait contre la MA (Panza *et al.*, 2004). Nous nous sommes intéressés à certaines composantes de cette diète, dont deux molécules antioxydantes qui se retrouvent dans l'huile d'olive : le tyrosol et l'OH-tyrosol. Dans un premier temps, le potentiel neuroprotecteur de ces deux molécules contre la toxicité du βA_{25-35} a été évalué. Ensuite, de possibles mécanismes de neuroprotection par le tyrosol et l'OH-tyrosol tel que le potentiel antioxydant, antiapoptotique et la modulation du NF- κ B ont été étudiés.

3.2.1 Potentiel neuroprotecteur du tyrosol et de l'hydroxytyrosol

Pour déterminer le potentiel neuroprotecteur du tyrosol et de l'OH-tyrosol, les tests de survie cellulaire XTT et de mortalité cellulaire LDH ont été utilisés. Le tyrosol et l'OH-tyrosol ont été utilisés à 50 et 100 μ M puisque selon la littérature, ces concentrations sont associées à la protection contre la toxicité du H_2O_2 (Manna *et al.*, 1997), un médiateur de la toxicité du βA (Behl *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1995). Pour le βA_{25-35} , une concentration de 150 μ g/mL a été utilisée (**figure 15**). La **figure 17** montre la mortalité des cellules N2a traitées avec le tyrosol et/ou le βA_{25-35} . D'abord, à 50 et à 100 μ M, le tyrosol ne présente aucune toxicité pour les cellules N2a ($104,9 \pm 9,2$ % et $100,7 \pm 9,5$ % respectivement) comparativement au témoin ($100,0 \pm 10,7$ %). Lorsque les cellules sont traitées avec le βA_{25-35} à 150 μ g/mL, il y a deux fois plus de LDH libérée dans le milieu de culture ($201,8 \pm 17,5$ %) comparativement aux cellules témoins ($100,0 \pm 10,7$ %). Le plus intéressant est que le co-traitement des cellules N2a avec le βA_{25-35} à 150 μ g/mL et le tyrosol, à 50 ou à 100 μ M, protège complètement de la toxicité induite par le βA_{25-35} , avec un pourcentage de LDH libérée dans le milieu similaire au témoin ($104,5 \pm 7,1$ % et $119,7 \pm 16,0$ % respectivement).

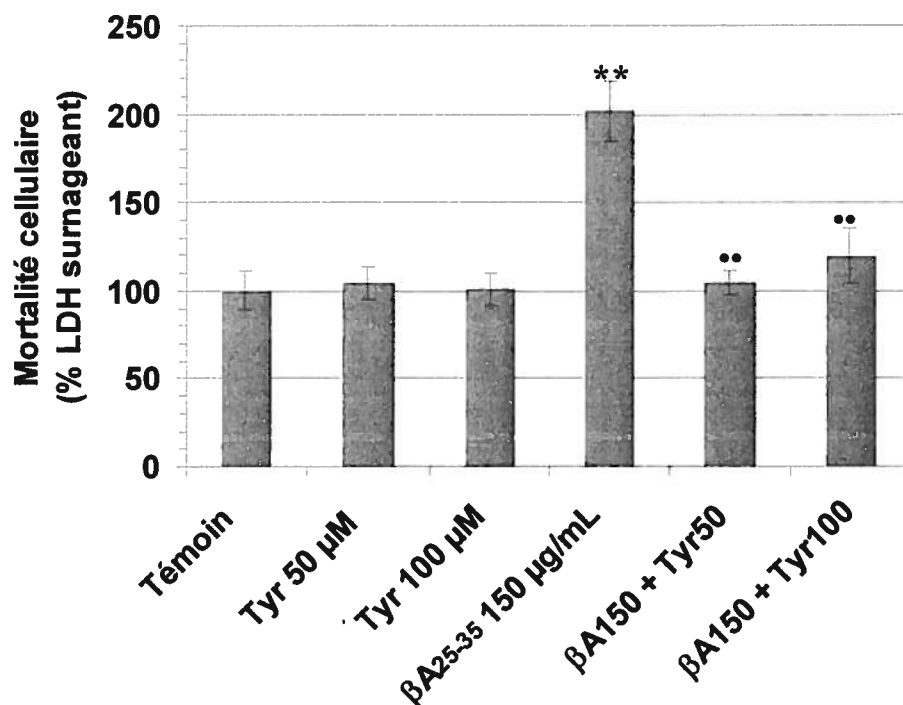


Figure 17. Protection des cellules N2a par le tyrosol contre la toxicité du βA_{25-35} (test de mortalité LDH).

Les cellules ont été traitées avec le tyrosol à 50 ou 100 μM et/ou βA_{25-35} à 150 $\mu g/mL$ (141 μM) pendant 24 heures. Les valeurs expriment la moyenne $\pm$ SEM de 3 expérimentations séparées, chacune répétée en triplicata. Significativement différent du: témoin (** $P < 0,01$), βA_{25-35} 150 $\mu g/mL$ (* $P < 0,01$).

La protection contre la toxicité du βA_{25-35} par le tyrosol sur les cellules N2a a aussi été vérifiée par le test de survie cellulaire XTT (**figure 18**). Tout comme pour le test de mortalité LDH, le test de survie cellulaire XTT a permis de constater que le tyrosol, à 50 et 100 μM , n'est pas toxique pour les cellules N2a. La survie des cellules est de $98,8 \pm 0,9$ % pour les traitements avec le tyrosol à 50 μM et de $97,0 \pm 0,9$ % pour les traitements avec le tyrosol à 100 μM , comparativement au témoin ($100,0 \pm 0,7$ %). La survie cellulaire est réduite d'environ 25 % ($75,3 \pm 2,4$ %) par rapport au témoin ($100,0 \pm 0,7$ %) lorsque les cellules N2a sont incubées 24 heures avec le βA_{25-35} à 150 $\mu g/mL$. Ce qui diffère des résultats obtenus avec le test de mortalité LDH, c'est la protection apportée par le tyrosol contre la toxicité du βA_{25-35} . Lorsque les cellules sont co-traitées avec le tyrosol à 100 μM et le βA_{25-35} à 150 $\mu g/mL$ ($80,9 \pm 2,1$ %), la survie des cellules est significativement plus élevée que la survie des cellules traitées avec le βA_{25-35} seulement ($75,3 \pm 2,4$ %). Par contre, la protection observée n'est pas aussi importante que celle observée avec le test de mortalité LDH où la protection se traduit par un signal équivalent

au signal témoin (**figure 17**). De plus, il n'y a aucune protection observée contre la toxicité du βA_{25-35} avec une concentration de tyrosol de 50 μM ($76,3 \pm 2,1$ %). Il semble donc que le tyrosol protège contre la toxicité du βA_{25-35} à une concentration de 100 μM . À 50 μM , nos résultats avec les tests LDH et XTT ne nous permettent pas de conclure.

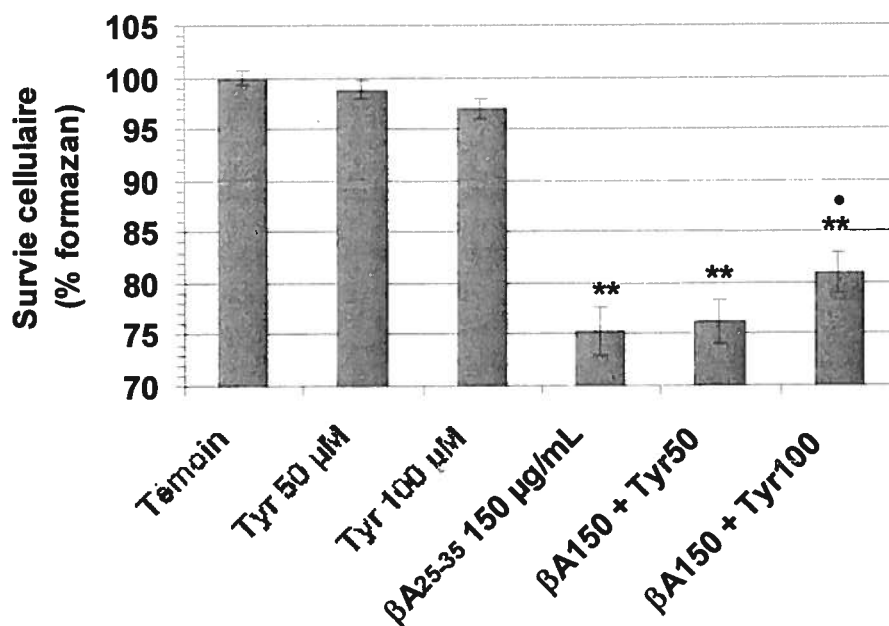


Figure 18. Protection des cellules N2a par le tyrosol contre la toxicité du βA_{25-35} (test de survie XTT). Les cellules ont été traitées avec le tyrosol à 50 ou 100 μM et/ou βA_{25-35} à 150 $\mu g/mL$ (141 μM) pendant 24 heures. Les valeurs expriment la moyenne $\pm$ SEM de 7 expérimentations séparées, chacune répétée en quadruplicata. Significativement différent du: témoin (** $P < 0,01$), βA_{25-35} 150 $\mu g/mL$ ($\cdot$ $P < 0,05$).

Le même cheminement a été fait pour l'OH-tyrosol, c'est-à-dire que nous avons évalué le potentiel neuroprotecteur de cette molécule contre la toxicité du βA_{25-35} sur les cellules N2a avec les tests de mortalité cellulaire LDH et de survie cellulaire XTT. Les résultats obtenus avec le test de mortalité cellulaire LDH montre que l'OH-tyrosol à 50 et à 100 μM n'est pas toxique pour les cellules N2a ($113,4 \pm 5,8$ % et $120,7 \pm 5,2$ % respectivement ; témoin = $100,0 \pm 4,9$ %) (**figure 19**). Lorsque les cellules N2a ont été traitées avec le βA_{25-35} à 150 $\mu g/mL$ seulement ($228,9 \pm 17,0$ %), la LDH libérée dans le milieu est deux fois plus élevée que pour le témoin ($100,0 \pm 4,9$ %). À 50 μM , l'OH-tyrosol protège partiellement contre la toxicité du βA_{25-35} en ramenant le niveau de LDH relâché par les cellules à $163,3 \pm 13,3$ % celui du témoin, ce qui est significativement

différent du βA_{25-35} seul ($228,9 \pm 17,0$ %). Par contre, avec $100 \mu M$ d'OH-tyrosol, il n'y a pas de protection contre la toxicité du βA_{25-35} , le niveau de LDH étant à $226,6 \pm 15,0$ % comparativement à $228,9 \pm 17,0$ % pour le βA seul.

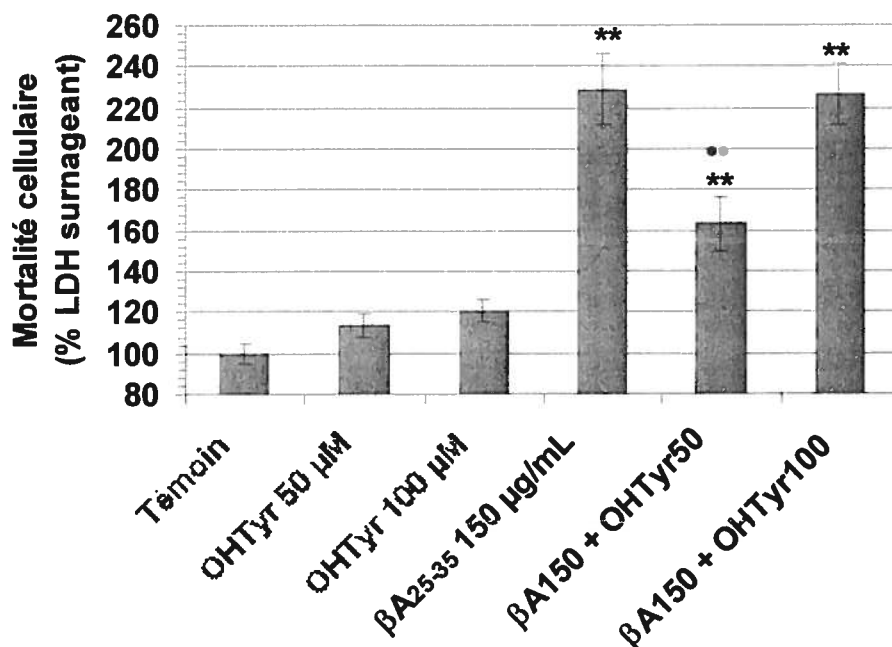


Figure 19. Protection des cellules N2a par l'OH-tyrosol contre la toxicité du βA_{25-35} (test de mortalité LDH).

Les cellules ont été traitées avec l'OH-tyrosol à 50 ou $100 \mu M$ et/ou βA_{25-35} à $150 \mu g/mL$ ($141 \mu M$) pendant 24 heures. Les valeurs expriment la moyenne $\pm$ SEM de 4 expérimentations séparées, chacune répétée en quadruplicata. Significativement différent du: témoin (** $P < 0,01$), βA_{25-35} $150 \mu g/mL$ (** $P < 0,01$).

Ces résultats obtenus avec le test de mortalité LDH ont été confirmés par ceux obtenus avec le test de survie XTT. En effet, l'OH-tyrosol, à 50 et $100 \mu M$ ($102,3 \pm 2,7$ % et $89,7 \pm 1,8$ %, respectivement), ne présente pas de toxicité sur les cellules N2a puisque la survie des cellules est similaire à ce qui est obtenu avec le témoin ($100,0 \pm 1,3$ %) (**figure 20**). Lorsque les cellules sont traitées avec le βA_{25-35} seulement, il y a une diminution significative de la survie des cellules comparativement au témoin ($83,2 \pm 3,4$ %). L'OH-tyrosol à $50 \mu M$ protège contre la toxicité du βA_{25-35} mais comparativement au test LDH où la protection est partielle, le test de survie XTT révèle plutôt une protection complète, avec une survie similaire au témoin ($105,5 \pm 5,9$ %) qui est significativement différente de la survie des cellules N2a traitées avec le βA seul ($83,2 \pm 3,4$ %).

Finalement, l'OH-tyrosol à 100 μM ne protège pas de façon significative les cellules de la toxicité du βA ($93,9 \pm 7,2 \%$).

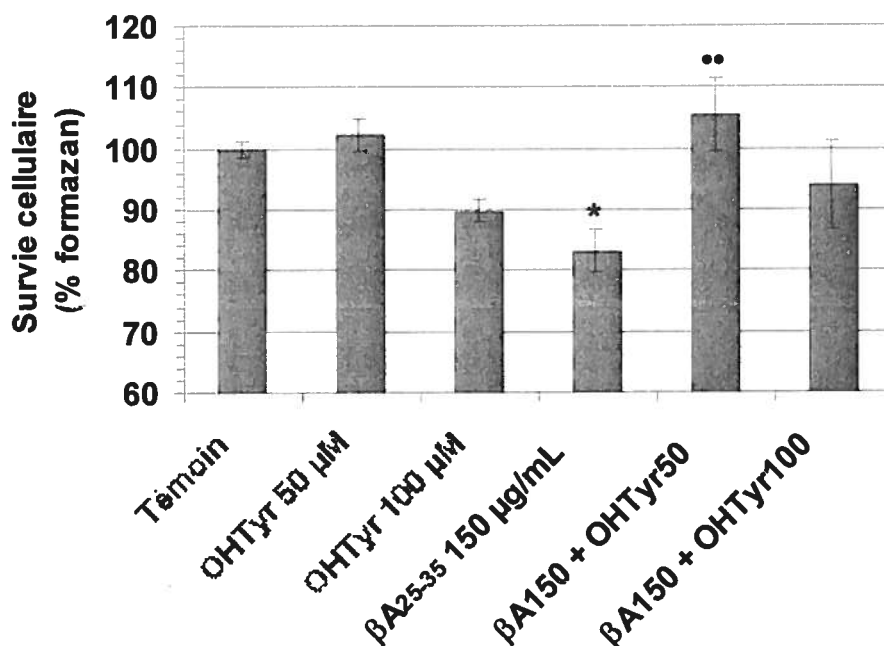


Figure 20. Protection des cellules N2a par l'OH-tyrosol contre la toxicité du βA_{25-35} (test de survie XTT).

Les cellules ont été traitées avec l'OH-tyrosol à 50 ou 100 μM et/ou βA_{25-35} à 150 $\mu\text{g/mL}$ (141 μM) pendant 24 heures. Les valeurs expriment la moyenne $\pm$ SEM de 4 expérimentations séparées, chacune répétée en quadruplicata. Significativement différent du: témoin (* $P < 0,05$), βA_{25-35} 150 $\mu\text{g/mL}$ (** $P < 0,01$).

3.2.2 Le potentiel antioxydant du tyrosol et de l'hydroxytyrosol

Un des mécanismes de toxicité du βA est l'induction d'un stress oxydant. Le tyrosol et surtout l'OH-tyrosol sont reconnus pour leur effet antioxydant ce qui pourrait expliquer leur effet protecteur contre la toxicité du βA_{25-35} . Pour vérifier si l'effet protecteur par ces deux molécules implique un mécanisme antioxydant, nous avons analysé leur capacité à protéger les cellules N2a contre la toxicité du H_2O_2 . Le H_2O_2 est un des médiateurs de la toxicité du βA (Behl C et al., 1994, Harris et al., 1995, Smith JV et Luo Y, 2003). Il entraîne la formation du radical hydroxyl ($\text{OH}\cdot$), un puissant oxydant très toxique pour les cellules. Nous avons d'abord établi la courbe effet-dose du H_2O_2 sur les cellules N2a avec le test de survie cellulaire XTT (**figure 21**). Nous avons choisi

d'utiliser une concentration en H_2O_2 de 2 mM pour vérifier le potentiel antioxydant du tyrosol et de l'OH-tyrosol.

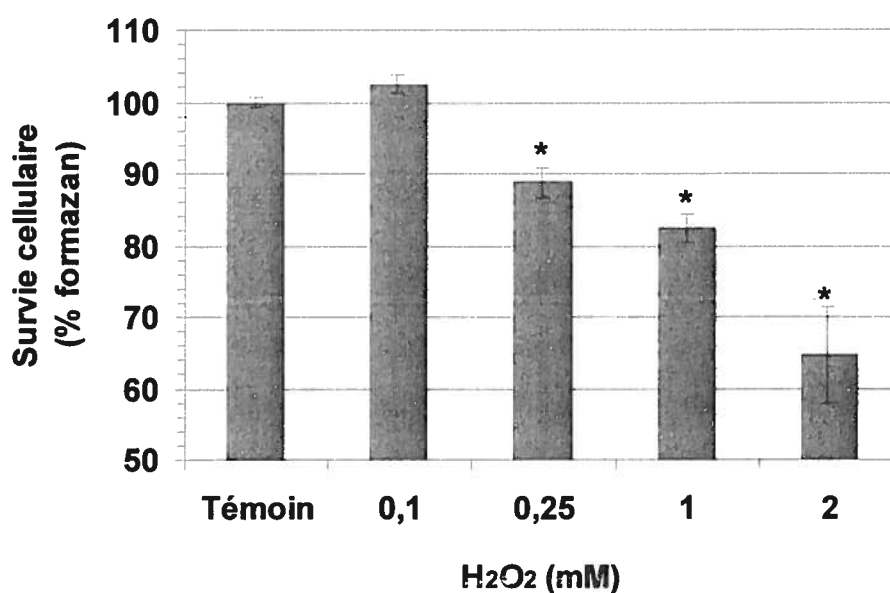


Figure 21. Effet-dose du H_2O_2 sur la survie des cellules N2a.

Les cellules ont été traitées avec le H_2O_2 pendant 24 heures. Moyenne $\pm$ SEM (n=4). Significativement différent du témoin (* $P < 0,05$).

Les concentrations de tyrosol et d'OH-tyrosol utilisées correspondent aux concentrations utilisées dans la neuroprotection contre la toxicité du βA_{25-35} , soit 50 et 100 μM . D'abord, le potentiel neuroprotecteur de l'OH-tyrosol contre la toxicité du H_2O_2 a été vérifié par le test de mortalité cellulaire LDH (**figure 22**). Tel que démontré précédemment (**figure 19**), l'OH-tyrosol à 50 et 100 μM ne présente aucune toxicité pour les cellules N2a ($113,4 \pm 5,8$ et $120,7 \pm 5,2$ % du témoin $100,0 \pm 4,9$ % respectivement). En utilisant 2 mM de H_2O_2 , l'activité de la LDH dans le surnageant ($306,4 \pm 12,3$ %) est trois fois plus importante que celle du témoin ($100,0 \pm 4,9$ %). L'OH-tyrosol, à 50 ou 100 μM , ne protège pas de la toxicité induite par le H_2O_2 à 2 mM, l'intensité des signaux obtenus étant similaire à ceux obtenus avec le H_2O_2 seul ($307,2 \pm 23,2$ et $335,0 \pm 25,4$ % du témoin respectivement).

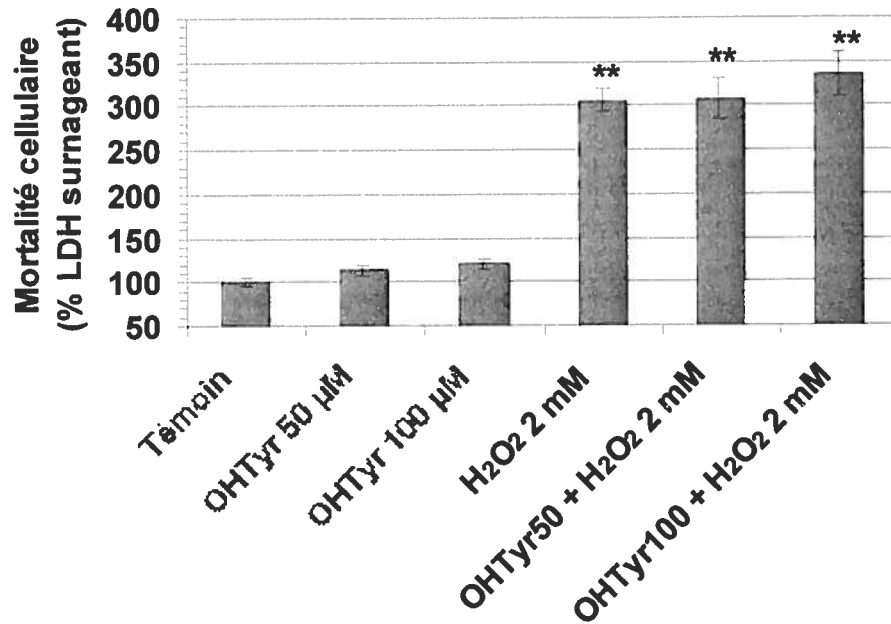


Figure 22. Effet de l'OH-tyrosol sur la toxicité du H₂O₂ chez les cellules N2a (test de mortalité LDH). Les cellules ont été traitées avec l'OH-tyrosol à 50 ou 100 µM et/ou H₂O₂ à 2 mM pendant 24 heures. Les valeurs expriment la moyenne $\pm$ SEM de 3 expérimentations séparées, chacune répétée en quadruplicata. Significativement différent du témoin (** P<0,01).

Ces résultats obtenus avec le test de cytotoxicité LDH ont été confirmés avec le test de survie cellulaire XTT. Ici encore, l'OH-tyrosol à 50 et 100 µM ne présente aucune toxicité pour les cellules N2a ($105,3 \pm 2,9$ et $96,5 \pm 3,7$ %) comparativement au témoin ($100,0 \pm 1,3$ %) (**figure 23**). Lorsque les cellules N2a ont été traitées avec 2 mM de H₂O₂, la survie des cellules était de $64,7 \pm 6,8$ % celle des cellules du témoin. Le co-traitement des cellules avec l'OH-tyrosol à 50 ou 100 µM ne protège pas les cellules de la toxicité du H₂O₂ ($67,8 \pm 8,3$ et $65,2 \pm 6,6$ %), confirmant les résultats obtenus avec le test LDH (**figure 22**).

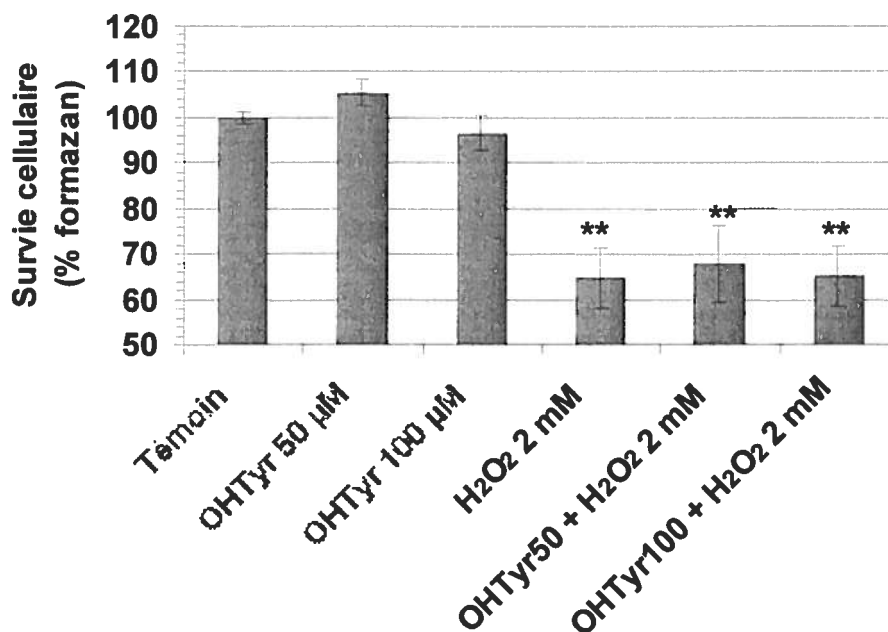


Figure 23. Effet de l'OH-tyrosol sur la toxicité du H₂O₂ chez les cellules N2a (test de survie XTT). Les cellules ont été traitées avec l'OH-tyrosol à 50 ou 100 µM et/ou H₂O₂ à 2 mM pendant 24 heures. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ SEM de 3 expérimentations séparées, chacune répétée en quadruplicata. Significativement différent du témoin (** P<0,01).

Puisqu'il n'y a pas de protection par l'OH-tyrosol lorsque les cellules N2a ont été traitées avec le H₂O₂ à 2 mM, nous avons traité les cellules avec une concentration toxique mais moins élevée de H₂O₂, soit 250 µM. La morphologie des cellules a ensuite été observée par microscopie et les photographies sont présentées à la **figure 24**. L'observation des cellules du témoin permet de constater que la morphologie des cellules N2a est normale, notamment la présence de prolongements et de dendrites qui sont indiqués par une flèche blanche. Les cellules N2a ayant été traitées avec l'OH-tyrosol à 50 et 100 µM ont une morphologie normale et ne se distinguent pas des cellules témoins. Par contre, chez les cellules traitées avec le H₂O₂ à 250 µM, il y a absence de projections et de dendrites et elles sont plus rondes que les cellules témoins. La présence d'OH-tyrosol à 50 µM protège de la toxicité du H₂O₂ à 250 µM ce qui est observé par la morphologie normale des cellules N2a et la présence de dendrites. Par contre, l'OH-tyrosol à 100 µM ne protège pas de la toxicité du H₂O₂ à 250 µM; la présence d'OH-tyrosol semble même augmenter la toxicité du H₂O₂. Ces résultats semblent appuyer

l'hypothèse selon laquelle l'OH-tyrosol protège partiellement, à 50 μM , contre la toxicité du βA par un mécanisme antioxydant.

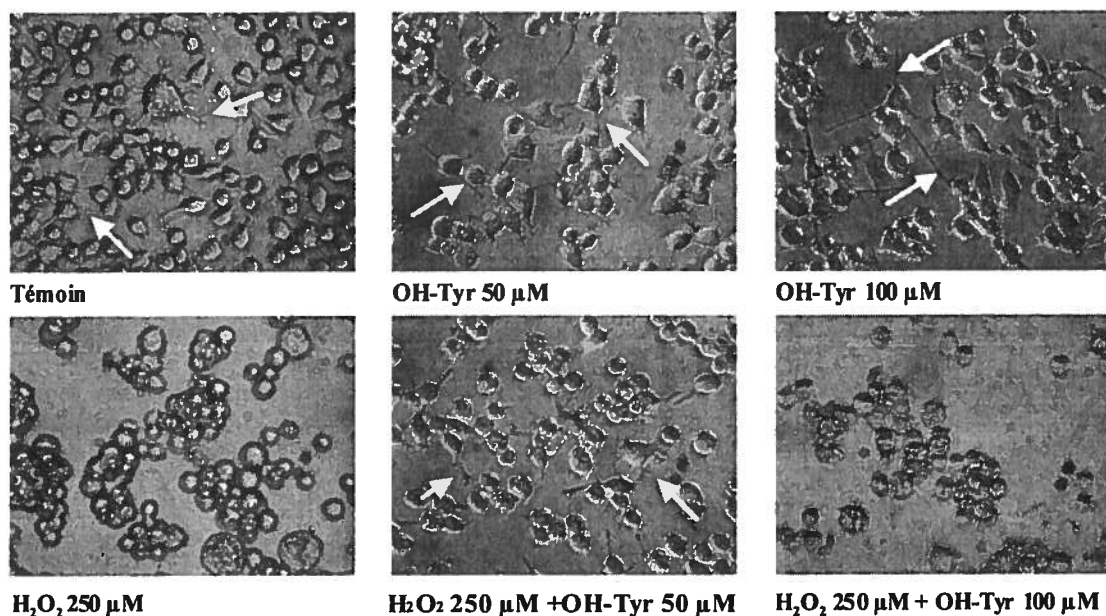


Figure 24. Effet de l'OH-tyrosol sur la toxicité du H_2O_2 chez les cellules N2a (microscopie). Les cellules ont été traitées avec l'OH-tyrosol à 50 ou 100 μM et/ou H_2O_2 à 250 μM pendant 24 heures. Grossissement 20 X.

L'OH-tyrosol, un antioxydant plus puissant que le tyrosol, ne protège pas de la toxicité du H_2O_2 à 2 mM mais protège du H_2O_2 à 250 μM . Nous avons donc choisis de vérifier l'effet antioxydant du tyrosol avec le H_2O_2 à 250 μM par le test de survie cellulaire XTT (**figure 25**) et par l'observation de la morphologie des cellules (**figure 26**). Tel qu'observé précédemment par le test de survie cellulaire XTT (**figure 18**), le tyrosol à 50 et 100 μM ne présente pas de toxicité pour les cellules N2a puisque le pourcentage de survie ($96,2 \pm 1,1$ et $95,9 \pm 2,9$ %) n'est pas significativement différent du témoin ($100,0 \pm 1,2$ %) (**figure 25**). Lorsque les cellules N2a sont traitées avec le H_2O_2 à 250 μM , la survie des cellules est diminuée à $79,4 \pm 2,3$ % et le tyrosol à 50 ou 100 μM n'a pas d'effet sur cette toxicité ($80,8 \pm 2,4$ et $81,9 \pm 1,6$ %).

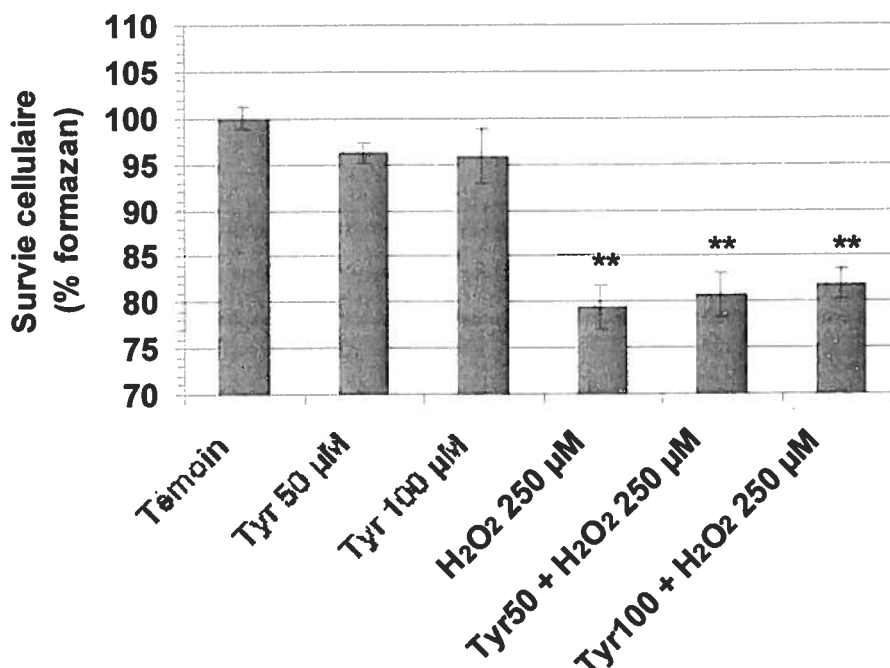


Figure 25. Effet du tyrosol sur la toxicité du H₂O₂ chez les cellules N2a (test de survie XTT). Les cellules ont été traitées avec le tyrosol à 50 ou 100 µM et/ou H₂O₂ à 250 µM pendant 24 heures. Les valeurs expriment la moyenne $\pm$ SEM de 4 expérimentations séparées, chacune répétée en quadruplicata. Significativement différent du témoin (** P<0,01).

Ces résultats obtenus avec le test de survie cellulaire XTT ont été confirmés par l'observation de la morphologie des cellules N2a par microscopie. Les photographies des cellules N2a sont présentées à la **figure 26**. Les cellules N2a du témoin ont une morphologie normale caractérisée par de nombreuses dendrites dont quelques-unes sont indiquées par des flèches blanches. La morphologie normale des cellules N2a n'est pas perturbée par le tyrosol à 50 ou 100 µM. Par contre, le traitement des cellules avec le H₂O₂ à 250 µM entraîne une diminution du nombre de cellules et des dendrites. Le tyrosol à 50 et 100 µM ne protège pas les cellules de la toxicité du H₂O₂ et semble même en augmenter la toxicité puisque qu'il y a absence de dendrite. Ces résultats permettent de constater que le tyrosol ne semble pas protéger contre la toxicité du β A₂₅₋₃₅ par un mécanisme antioxydant.

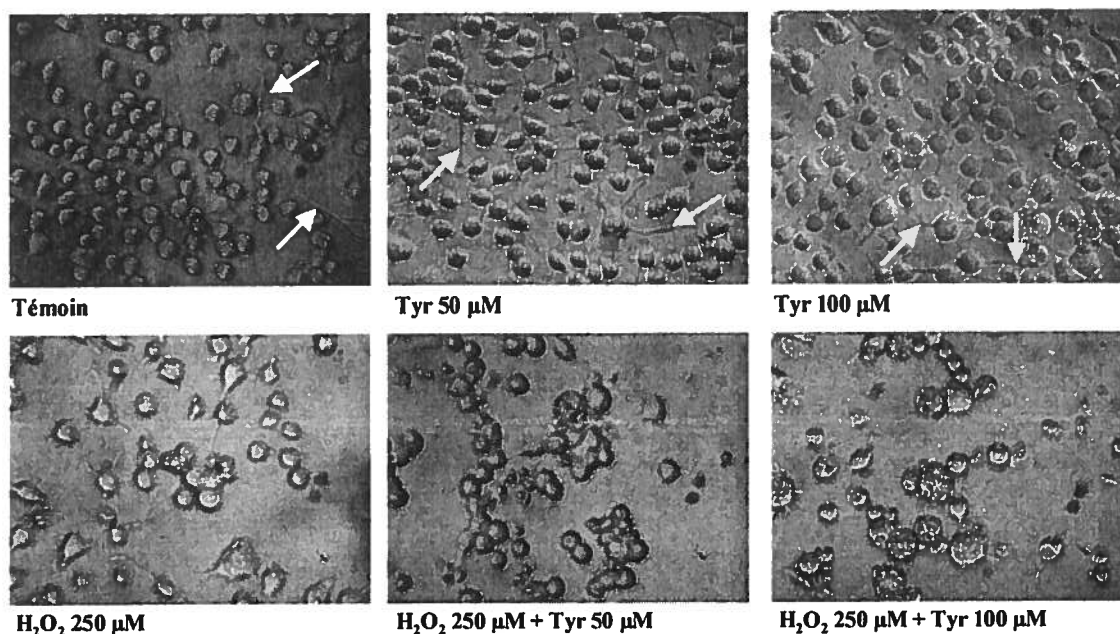
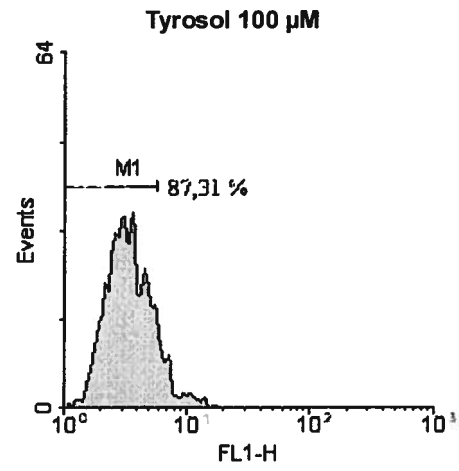
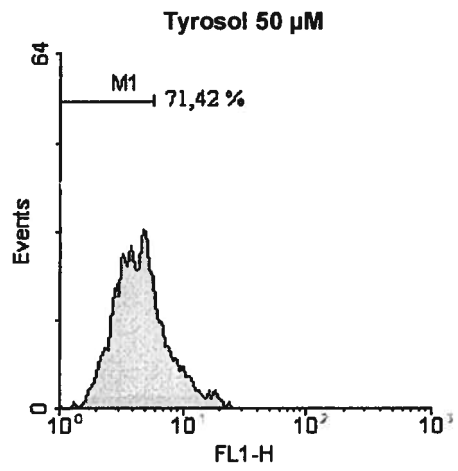
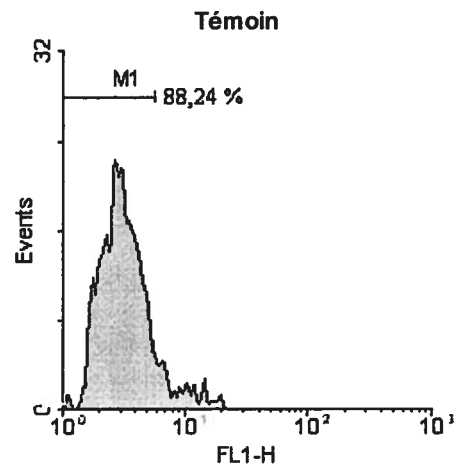
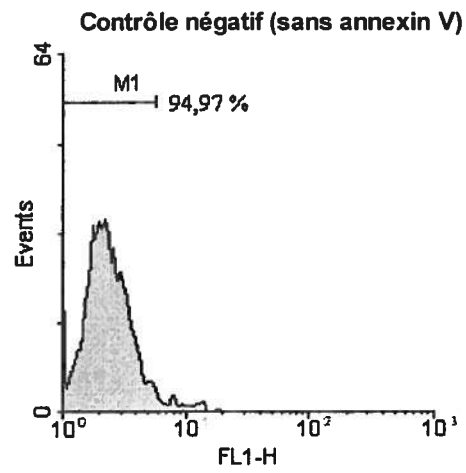


Figure 26. Effet du tyrosol sur la toxicité du H₂O₂ chez les cellules N2a (microscopie). Les cellules ont été traitées avec le tyrosol à 50 ou 100 μM et/ou H₂O₂ à 250 μM pendant 24 heures. Grossissement 20 X.

3.2.3 Le potentiel anti-apoptotique du tyrosol et de l'hydroxytyrosol

Outre l'induction d'un stress oxydant, le β A entraîne également l'apoptose neuronale. Nous avons étudié l'effet anti-apoptotique du tyrosol et de l'OH-tyrosol dans la protection contre la toxicité du β A. La cytométrie en flux a permis d'étudier le potentiel anti-apoptotique du tyrosol contre la toxicité du β A₂₅₋₃₅ en utilisant l'annexine V couplée au FITC. Les résultats sont présentés à la **figure 27**. D'abord, le marqueur M1 indique le pourcentage d'événements (le nombre de cellules) dont l'intensité de la fluorescence se situe entre 10^0 et 10^1 , zone que nous appellerons ici « zone témoin ». Mentionnons que plus la courbe se déplace vers la droite sur l'axe des x, plus l'intensité de la fluorescence est importante et plus il y a de cellules en processus d'apoptose. Chez le contrôle négatif, 94,97 % des cellules se situent dans cette zone alors que chez les cellules témoins, il y en a 88,24 %. Chez les cellules traitées avec le tyrosol à 50 μM, 71,42 % des cellules se retrouvent dans la zone témoin, ce qui est une diminution de 16,82 % comparativement au témoin. Ce résultat est surprenant puisque les tests de mortalité cellulaire LDH (**figure 15**) et de survie cellulaire XTT (**figure 16**) ont démontré

que le traitement des cellules N2a pendant 24 heures avec le tyrosol à 50 μM n'est pas toxique pour les cellules N2a. Lorsque 100 μM de tyrosol est utilisé, 87,31 % des cellules sont dans la zone témoin, ce qui est très similaire aux cellules témoins et confirme les résultats obtenus par les tests de mortalité cellulaire LDH (**figure 17**) et de survie cellulaire XTT (**figure 18**). Ce résultat confirme que le tyrosol n'est pas toxique pour les cellules N2a. Le traitement des cellules avec le βA_{25-35} à 150 $\mu\text{g/mL}$ entraîne une diminution du nombre de cellules dans la zone témoin à 61,28 %, indiquant ainsi qu'il y a une augmentation du nombre de cellules apoptotiques. Lorsque les cellules sont co-traitées avec le βA_{25-35} à 150 $\mu\text{g/mL}$ et le tyrosol 50 à μM , il y a une augmentation du nombre de cellules dans la zone témoin (75,72 %) comparativement aux cellules traitées seulement avec le βA_{25-35} à 150 $\mu\text{g/mL}$ (61,28 %). Le co-traitement des cellules N2a avec le βA_{25-35} à 150 $\mu\text{g/mL}$ et le tyrosol à 100 μM n'entraîne pas de changement au niveau des cellules dans la zone témoin (64,45 %) comparativement aux cellules traitées avec le βA_{25-35} à 150 $\mu\text{g/mL}$ (61,28 %). En conclusion, ce résultat n'est pas en accord avec les résultats obtenus par les tests de mortalité LDH (**figure 17**) et de survie cellulaire XTT (**figure 18**).



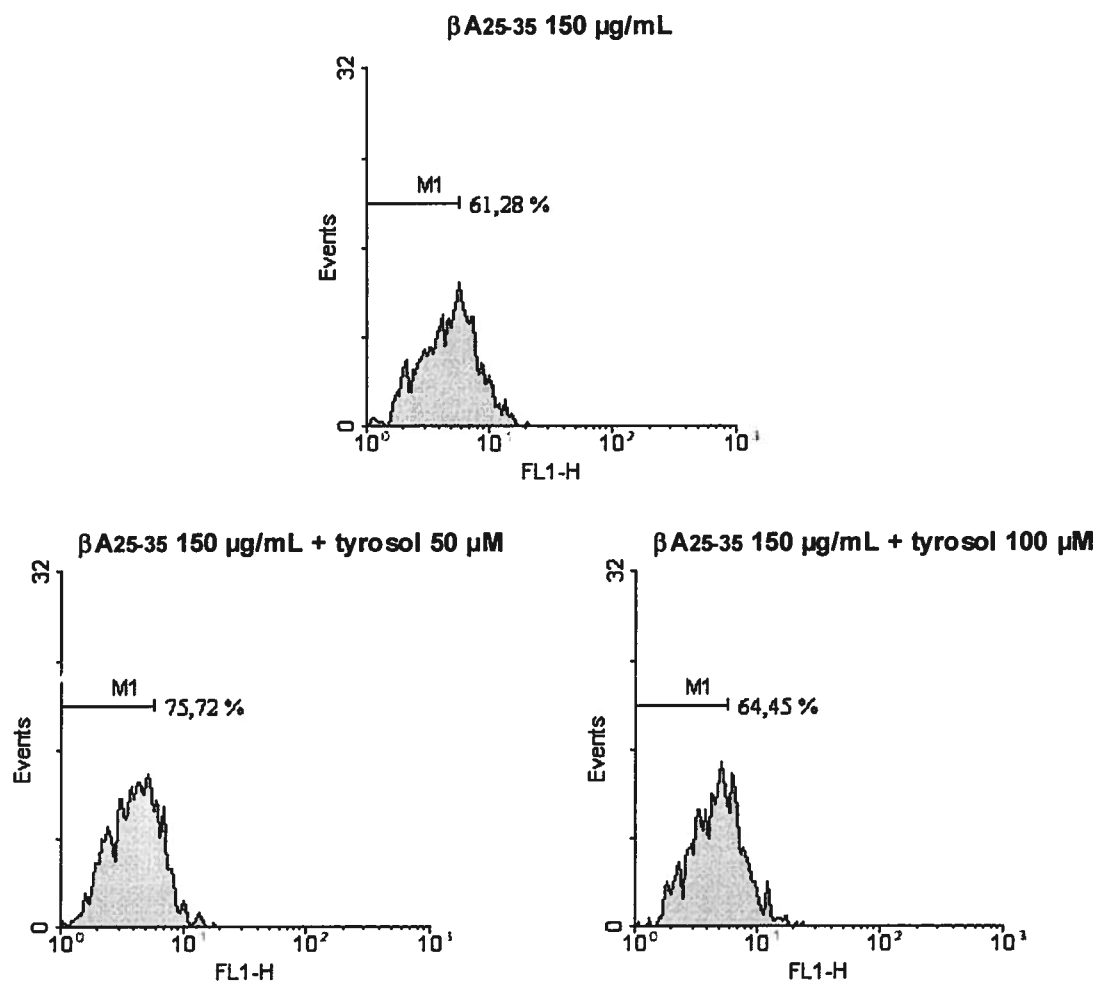


Figure 27. Effet du tyrosol sur l'apoptose des cellules N2a induite par le βA_{25-35} . Les cellules ont été traitées avec le tyrosol à 50 ou 100 μM et/ou βA_{25-35} à 150 $\mu\text{g/mL}$ pendant 24 heures. Le marqueur d'apoptose annexine V-FITC a été détecté par cytométrie en flux (n=2).

3.2.4 Modulation du facteur de transcription nucléaire κB par le tyrosol et l'hydroxytyrosol

Puisque plusieurs antioxydants peuvent moduler l'activité constitutive et induite du NF- κB , nous nous sommes intéressés à l'effet du tyrosol et de l'OH-tyrosol sur le NF- κB dans la protection contre la toxicité du βA_{25-35} . Les cellules N2a ont été traitées pendant 30 minutes avec le tyrosol ou l'OH-tyrosol et/ou le βA_{25-35} à 100 $\mu\text{g/mL}$ et la modulation de l'activité du NF- κB a été étudiée par immunobuvardage. À la **figure 28**

sont présentés les résultats obtenus pour l'étude de la modulation du NF- κ B par le tyrosol dans la protection contre la toxicité du β A₂₅₋₃₅. Le tyrosol seul n'a pas d'effet sur le NF- κ B. Bien qu'avec 50 μ M de tyrosol il y ait une légère augmentation des niveaux cytoplasmique et nucléaire de p65, ces variations ne sont pas significativement différentes du niveau des témoins. Tel que vu précédemment (**figure 16**), le β A₂₅₋₃₅ n'a pas d'effet sur les niveaux cytoplasmiques de p65 et I κ B β et sur le niveau nucléaire de p65. Le co-traitement des cellules avec le tyrosol et le β A₂₅₋₃₅ n'a pas d'effet sur l'activité du NF- κ B.

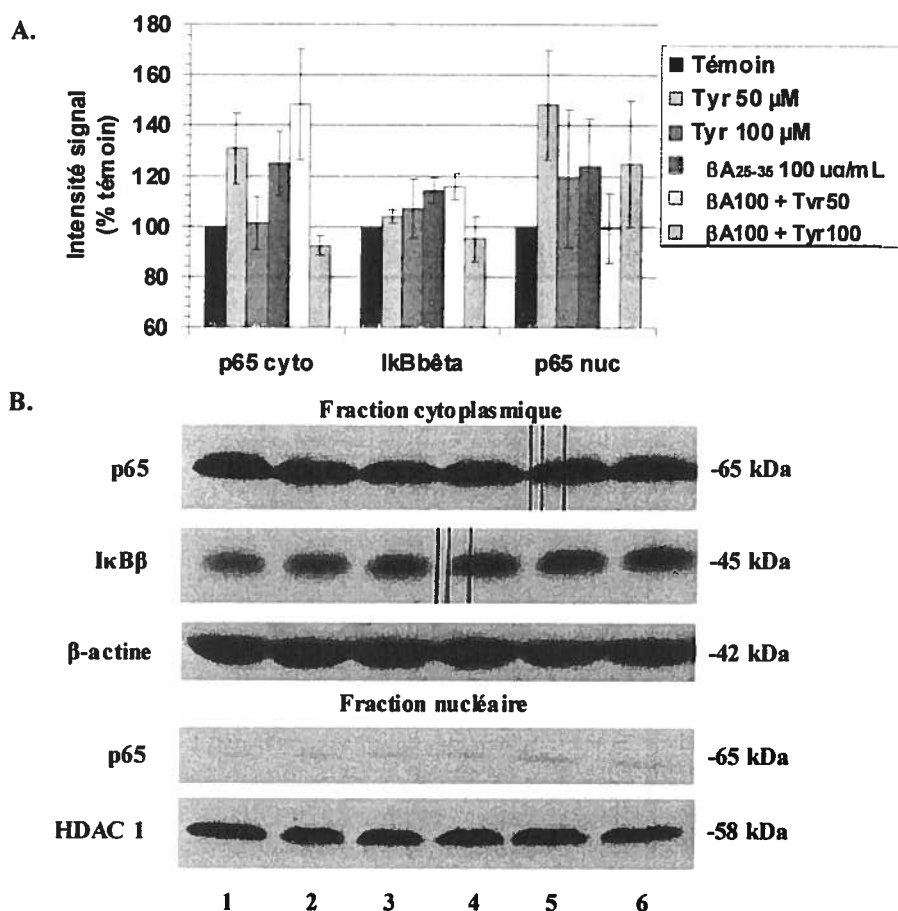


Figure 28. Modulation du NF- κ B par le tyrosol et/ou β A₂₅₋₃₅. Cellules N2a traitées 30 minutes avec le tyrosol à 50 ou 100 μ M et/ou β A₂₅₋₃₅ à 100 μ g/mL (94,3 μ M). Immunobuvardage NF- κ B.

- Niveaux cytoplasmiques de p65 et I κ B β et niveau nucléaire de p65 exprimés par l'intensité du signal en % du témoin. Moyenne $\pm$ SEM (n=4). Aucun traitement ne permet d'obtenir un pourcentage significativement différent du témoin.
- p65 (65 kDa) et I κ B β (45 kDa) dans la fraction cytoplasmique et p65 dans la fraction nucléaire: 1-Témoin; 2-tyrosol 50 μ M; 3-tyrosol 100 μ M; 4- β A₂₅₋₃₅ 100 μ g/mL; 5- β A₂₅₋₃₅ 100 μ g/mL + tyrosol 50 μ M et 6- β A₂₅₋₃₅ 100 μ g/mL + tyrosol 100 μ M. Les membranes ont été décapées et incubées avec un anticorps monoclonal anti- β -actine (42 kDa) dans le cas de la fraction cytoplasmique et anti-HDAC1 (58 kDa) dans le cas de la fraction nucléaire pour contrôler la quantité de protéines déposée sur le gel.

Les résultats obtenus dans l'étude de la modulation du NF- κ B par l'OH-tyrosol dans la protection contre la toxicité du βA_{25-35} sont présentés à la **figure 29**. Lorsque les cellules N2a ont été traitées seulement avec l'OH-tyrosol (50 ou 100 μ M), l'intensité du signal de p65 cytoplasmique ($106,7 \pm 5,8$ et $102,4 \pm 14,0$ % respectivement), d'I κ B β cytoplasmique ($117,3 \pm 19,9$ et $144,7 \pm 23,4$ % respectivement) et de p65 nucléaire ($162,5 \pm 37,5$ et $212,5 \pm 51,5$ % respectivement) ne sont pas significativement différents de l'intensité du signal des cellules témoins. Ces résultats permettent de constater que l'OH-tyrosol semble causer une augmentation de l'intensité du signal de p65 nucléaire mais les variations entre les immunobuvardages sont trop importantes pour obtenir une valeur moyenne significativement différente de la valeur des cellules témoins. Le traitement des cellules N2a avec βA_{25-35} à 100 μ g/mL ne cause pas de changement dans l'intensité du signal de p65 cytoplasmique ($122,8 \pm 12,1$ %), d'I κ B β cytoplasmique ($117,6 \pm 5,8$ %) et de p65 nucléaire ($132,4 \pm 19,4$ %) qui ne sont pas significativement différents de l'intensité du signal des cellules témoins. Le co-traitement des cellules N2a avec l'OH-tyrosol à 50 μ M ou 100 μ M et le βA_{25-35} à 100 μ g/mL n'a pas d'effet sur l'intensité du signal pour p65 cytoplasmique ($124,1 \pm 22,2$ et $126,3 \pm 10,1$ % respectivement) comparativement à l'intensité du signal des cellules témoins. Par contre, ce qui est très intéressant, c'est l'augmentation de l'intensité du signal d'I κ B β ($230,8 \pm 53,9$ %) et de p65 nucléaire ($312,5 \pm 119,7$ %) lorsque les cellules sont co-traitées avec l'OH-tyrosol à 50 μ M et le βA_{25-35} à 100 μ g/mL. De plus, lorsque les cellules sont co-traitées avec l'OH-tyrosol à 100 μ M et le βA_{25-35} à 100 μ g/mL, il n'y a pas de différence significative dans l'intensité du signal d'I κ B β ($170,1 \pm 35,1$ %) et de p65 nucléaire ($187,5 \pm 51,5$ %). Selon ces résultats, la concentration protectrice d'OH-tyrosol (50 μ M) en co-traitement avec le βA_{25-35} entraîne une activation du NF- κ B qui s'observe par le passage de p65 dans le noyau des cellules et par une resynthèse d'I κ B β . Ce phénomène ne s'observe pas lorsque la concentration d'OH-tyrosol (100 μ M) qui ne protège pas de la toxicité du βA_{25-35} est utilisée.

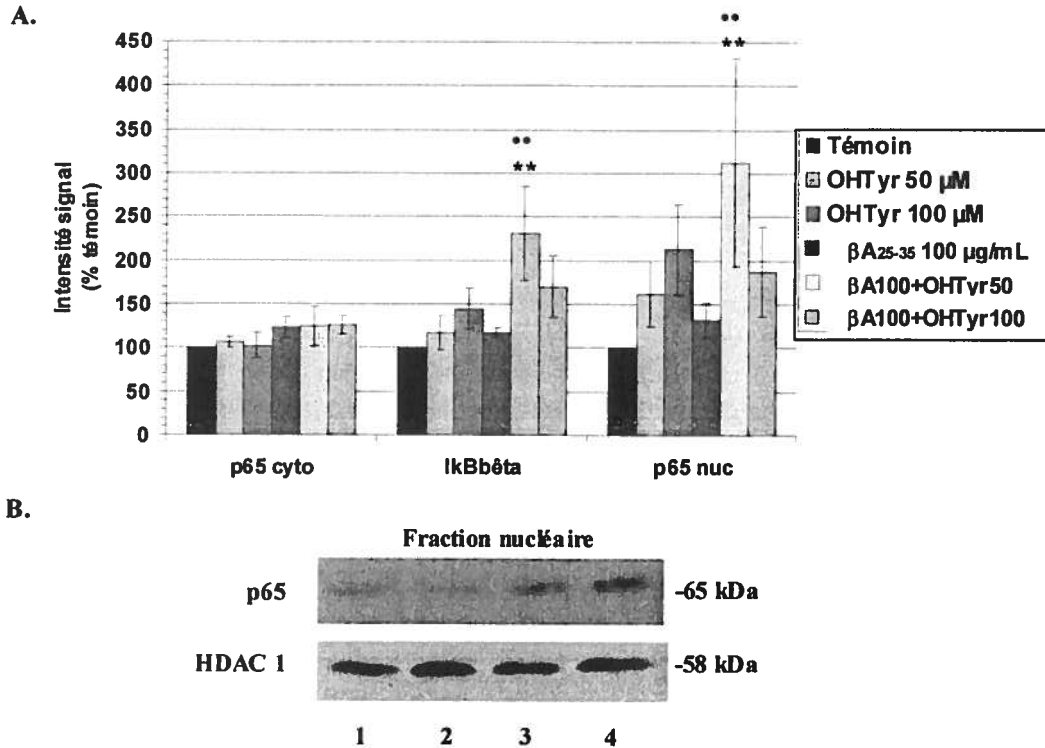


Figure 29. Modulation du NF-κB par l'OH-tyrosol et/ou βA₂₅₋₃₅.

Cellules N2a traitées 30 minutes avec l'OH-tyrosol à 50 ou 100 μM et/ou βA₂₅₋₃₅ à 100 μg/mL (94,3 μM). Immunobuvardage NF-κB.

- A. Niveaux cytoplasmiques de p65 et IκBβ et niveau nucléaire de p65 exprimés par l'intensité du signal en % du témoin. Moyenne ± SEM (n=4). Significativement différent : témoin (** P<0,01), βA₂₅₋₃₅ 100 μg/mL (** P<0,01).
- B. p65 (65 kDa) dans la fraction nucléaire: 1-Témoin; 2-tyrosol 50 μM; 3-βA₂₅₋₃₅ 100 μg/mL et 4-βA₂₅₋₃₅ 100 μg/mL + tyrosol 50 μM. La membrane a été décapée et incubée avec un anticorps anti-HDAC1 (58 kDa) dans le cas de la fraction nucléaire pour contrôler la quantité de protéines déposée sur le gel.

3.3 Implication du facteur de transcription nucléaire κB dans la synthèse du peptide β-amyloïde.

Comme la séquence κB se retrouve sur le promoteur du gène du PPA, la protéine précurseur du βA, nous nous sommes intéressés à la régulation de la synthèse du βA par le NF-κB. Le niveau de βA₁₋₄₀ et de βA₁₋₄₂ ont été détecté, par ELISA, dans le striatum, l'hippocampe et les cortex frontal et temporal de souris p50^{-/-}. La **figure 30** présente les résultats obtenus dans la détection du βA₁₋₄₀. Chez les souris sauvages, le niveau de βA₁₋₄₀ détecté dans le cortex temporal (0,138 ± 0,007 ng/100 μg de tissus) est beaucoup plus élevé que le βA₁₋₄₀ dans le striatum (0,044 ± 0,002 ng/100 μg de tissus), le cortex frontal

($0,050 \pm 0,000$ ng/100 μ g de tissus) et l'hippocampe ($0,043 \pm 0,001$ ng/100 μ g de tissus). Ensuite, il y a une différence significative dans les niveaux de βA_{1-40} entre le groupe de souris sauvage et le groupe p50 -/- pour le striatum (sauvage = $0,044 \pm 0,002$ et p50 -/- = $0,081 \pm 0,001$ ng/100 μ g de tissus), l'hippocampe (sauvage = $0,043 \pm 0,001$ et p50 -/- = $0,111 \pm 0,017$ ng/100 μ g de tissus) et le cortex temporal (sauvage = $0,138 \pm 0,007$ et p50 -/- = $0,185 \pm 0,004$ ng/100 μ g de tissus). Le niveau de βA_{1-40} n'est pas changé dans le cortex frontal des souris p50 -/- ($0,060 \pm 0,001$ ng/100 μ g de tissus) comparativement aux souris sauvages ($0,050 \pm 0,000$ ng/100 μ g de tissus).

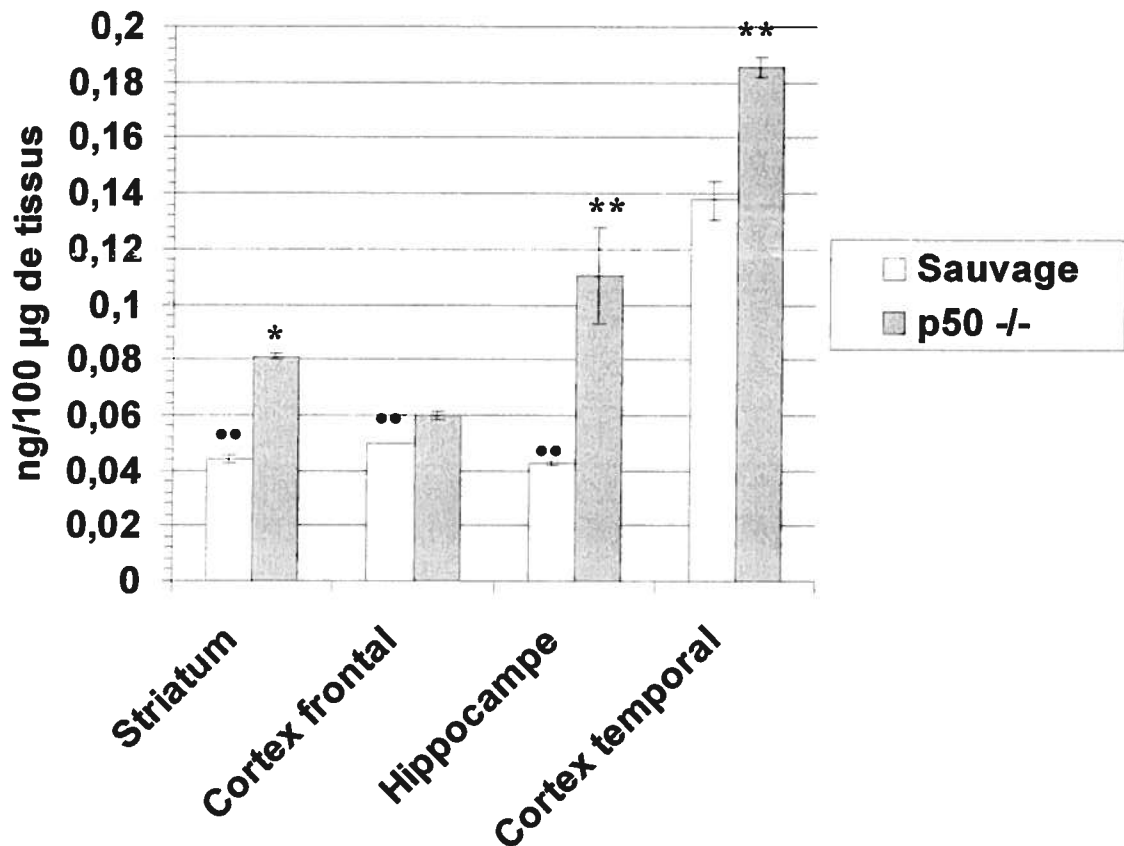


Figure 30. Quantité de βA_{1-40} dans les structures cérébrales de souris déficientes en la sous-unité p50 du NF- κ B (p50 -/-). Moyenne $\pm$ SEM (n=2). Significativement différent : souris sauvages (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$), souris sauvages « cortex temporal » ** $P < 0,01$.

La **figure 31** présente les résultats obtenus dans la détection du βA_{1-42} . Chez les souris sauvages, les concentrations de βA_{1-42} détectées dans le striatum ($0,840 \pm 0,120$ ng/100 μ g de tissus), le cortex frontal ($0,932 \pm 0,201$ ng/100 μ g de tissus), l'hippocampe

($1,040 \pm 0,467$ ng/100 μ g de tissus) et le cortex temporal ($1,367 \pm 0,043$ ng/100 μ g de tissus) ne sont pas significativement différentes. Ensuite, il y a une différence significative entre les concentrations de βA_{1-42} des souris sauvages et p50 $-/-$ dans le cortex temporal (sauvage = $1,367 \pm 0,043$ et p50 $-/-$ = $3,002 \pm 0,290$ ng/100 μ g de tissus). Dans le striatum (sauvage = $0,840 \pm 0,120$ et p50 $-/-$ = $0,937 \pm 0,033$ ng/100 μ g de tissus), le cortex frontal (sauvage = $0,932 \pm 0,201$ et p50 $-/-$ = $1,124 \pm 0,273$) et l'hippocampe (sauvage = $1,040 \pm 0,467$ et p50 $-/-$ = $0,981 \pm 0,061$ ng/100 μ g de tissus), il n'y a pas de différence significative entre les concentrations de βA_{1-42} des souris sauvages et p50 $-/-$.

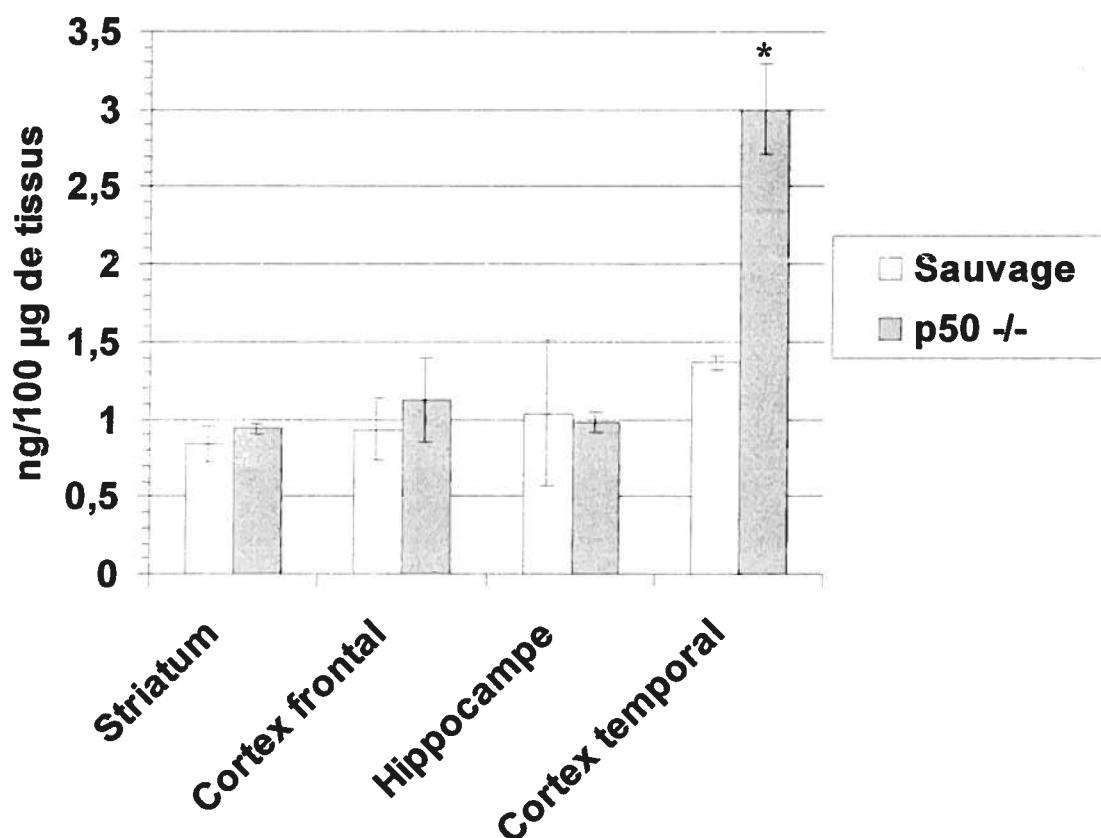


Figure 31. Quantité de βA_{1-42} dans les structures cérébrales de souris déficientes en la sous-unité p50 du NF- κ B (p50 $-/-$).

Moyenne $\pm$ SEM (n=2). Significativement différent des souris sauvages (** P<0,01).

CHAPITRE 4

Discussion

4.1 Mécanismes de protection de l'EGb 761 contre la toxicité du peptide β -amyloïde et implication des flavonoïdes et du ginkgolide B.

4.1.1 L'EGb 761 et les flavonoïdes: inhibition de la fibrillation du peptide β -amyloïde

D'abord, l'implication des flavonoïdes et du ginkgolide B dans l'inhibition de la fibrillation du β A par l'EGb 761 a été étudiée par microscopie électronique. Le β A est toxique lorsqu'il est sous forme fibrillaire (Pike *et al.*, 1993; Lorenzo et Yankner, 1994; Ward R.V. *et al.*, 2000). Récemment, Luo *et al.* (2002) ont démontré par la méthode de la thioflavine T (LeVine III et Scholten, 1999) que l'EGb 761 (100 μ g/mL) inhibe environ 82 % de la fibrillation du β A₁₋₄₀ (46 μ M) et cet effet a été attribué en grande partie au bilobalide et au ginkgolide J. Dans la présente étude, les résultats obtenus par microscopie électronique démontrent clairement que l'EGb 761 à 20 μ g/mL et le CP205 à 10 μ g/mL (flavonoïdes) inhibent complètement la fibrillation du β A₁₋₄₀ (**figure 5**). Le CP205 pourrait prévenir la fibrillation du β A en empêchant la production de ROS. En effet, le β A (1-40 et 25-35) en solution aqueuse génère des ROS nécessaires à la fibrillation du peptide (Hensley K. *et al.*, 1994, Harris M.E. *et al.*, 1995). Il a été démontré que le CP205 inhibe la production de ROS induite par le β A₂₅₋₃₅ (Bastianetto S. et Quirion R., 2002). Selon nos résultats, le BN52021 à 10 μ g/mL (ginkgolide B) n'a pas d'effet anti-fibrillaire sur le β A₁₋₄₀. D'ailleurs, cette sous-fraction de l'EGb 761 ne réduit pas la production de ROS induite par le β A (Bastianetto S. et Quirion R., 2002). Luo *et al.* (2002) ont observé une diminution de la fibrillation du β A d'environ 20 % par le ginkgolide B. Cette différence dans le potentiel anti-fibrillaire du ginkgolide B pourrait être attribuable aux concentrations de ginkgolide B et de β A₁₋₄₀ utilisées. En effet, nous avons utilisé 10 μ g/mL de ginkgolide B incubé avec 1 mg/mL (236 μ M) de β A₁₋₄₀ alors que Luo *et al.* (2002) ont utilisé 29 μ g/mL de ginkgolide B et 46 μ M de β A₁₋₄₀. Or, la fibrillation du β A est dépendante de sa concentration (Blaine Stine *et al.*, 2003). Il est

possible que le ginkgolide B ait un faible pouvoir anti-fibrillaire peu efficace sur la concentration de βA que nous avons utilisé. L'EGB 761 est donc très efficace pour inhiber la fibrillation du βA . Les flavonoïdes contenus dans cet extrait sont impliqués dans cet inhibition.

Par les tests de survie cellulaire XTT et de cytotoxicité LDH, nous avons constaté que l'inhibition de la fibrillation du βA_{1-40} par l'EGB 761 et le CP205 est associée à une diminution de sa toxicité sur les cellules N2a (**figures 6 et 7**). Cependant, bien que le ginkgolide B n'ait pas d'effet anti-amyloïdogénique, il protège également de la toxicité du βA_{1-40} . La protection par le ginkgolide B contre la toxicité du βA implique sans aucun doute d'autres mécanismes de protection. Yao *et al.* (1999) ont observé que le ginkgolide B prévient la production de 4-HNE, un produit de la peroxydation lipidique, induite par le βA_{1-42} . Nous avons également observé que le βA_{25-35} n'ayant pas subi de processus de vieillissement, contrairement au βA_{1-40} , est toxique chez les cellules N2a, ce qui est en accord avec les résultats de Pike *et al.* (1993). Ces auteurs ont également rapporté la formation de fibrilles par le βA_{25-35} immédiatement suivant sa solubilisation en milieu aqueux, ce qui expliquerait pourquoi le processus de vieillissement n'est pas nécessaire pour que ce peptide soit toxique, comparativement au βA_{1-40} . D'ailleurs, les espèces radicalaires nécessaires à la fibrillation du βA_{25-35} sont détectées immédiatement suivant sa solubilisation alors que le βA_{1-40} doit être pré-incubé avant d'être toxique et les espèces radicalaires sont détectées seulement après plusieurs heures de vieillissement (Hensley *et al.*, 1994). Comme précédemment démontré par plusieurs études, nous avons observé une protection par l'EGB 761 contre la toxicité du βA_{25-35} (Bastianetto *et al.*, 2000; Bastianetto et Quirion, 2002). Par contre, les résultats que nous avons obtenus par les tests de cytotoxicité LDH et de survie cellulaire XTT pour évaluer la protection par le CP205 et le BN52021 contre la toxicité du βA_{25-35} diffèrent. Avec le test de survie cellulaire XTT, le CP205 et le BN52021 protègent contre la toxicité du βA_{25-35} alors que le test de cytotoxicité LDH ne montre aucune protection significative. De plus, nous n'avons pas fait de microscopie électronique pour visualiser l'état de la fibrillation du βA_{25-35} . Les résultats obtenus avec le βA_{25-35} méritent d'être approfondie. L'inhibition de la fibrillation du βA_{1-40} par l'EGB 761 et le CP205 est associée à la protection contre la

toxicité de ce peptide. Le BN52021 protège contre la toxicité du βA_{1-40} sans inhiber sa fibrillation suggérant que d'autres mécanismes de protection sont impliqués.

4.1.2 Modulation du NF- κ B : inhibition par l'EGB 761, activation par les flavonoïdes et le ginkgolide B

EGB 761 protège de la toxicité du βA notamment par des mécanismes anti-fibrillaires mais également par son pouvoir antioxydant. Or, le NF- κ B est sensible au potentiel rédox intracellulaire (Behl *et al.*, 1994; Das, Lewis-Molock et White, 1995). Certaines études ont montré que l'activation du NF- κ B est essentielle pour la survie de divers types de cellule (Ivanov *et al.*, 1995; Maggiwar *et al.*, 1998; Mattson *et al.*, 1997; Taglialatela *et al.*, 1997;). À l'opposé, d'autres études ont montré que l'activation du NF- κ B favorise plutôt l'apoptose des cellules neuronales (Grilli *et al.*, 1996; Kruman *et al.*, 1997; Panet *et al.*, 2001). L'orientation pro- ou anti apoptotique à la suite de l'activation de NF- κ B dépendrait donc du stimulus et de son intensité. Nous avons émis l'hypothèse que l'EGB 761 puisse, par son pouvoir antioxydant, moduler l'activité du NF- κ B et que cette modulation soit associée à la protection contre la toxicité du βA . Nous avons étudié la modulation du NF- κ B par immunobuvardage. Dans un premier temps, nous avons examiné l'effet de l'EGB 761 sur l'activité de ce facteur de transcription. À 50 et à 100 μ g/mL, l'EGB 761 entraîne la réduction de l'I κ B β dans le cytoplasme des cellules N2a (**figure 11**) et du p50 et du p65 dans le noyau des cellules (**figure 12**). Ces résultats suggèrent que l'EGB 761 inhibe l'activité du NF- κ B.

Pour confirmer l'effet inhibiteur de l'EGB 761, nous avons étudié sa capacité à réduire l'activation du NF- κ B induite par la cycloheximide (**figure 13**). Ce composé, un inhibiteur de la synthèse des protéines, augmente l'activité du NF- κ B car il empêche notamment la synthèse de la protéine inhibitrice I κ B (Sen et Baltimore, 1986). Les cellules N2a ont d'abord été traitées pendant 2 heures avec la cycloheximide. Puis, elles ont été traitées 15 minutes avec l'EGB 761, à 50 et à 100 μ g/mL. Nous avons alors constaté, par immunobuvardage, que l'EGB 761 réduit également l'activité du NF- κ B induite par la cycloheximide, ce qui est en accord avec plusieurs études qui démontrent que divers antioxydants réduisent l'activité induite du NF- κ B (Jang et Surh, 2003;

Moreira *et al.*, 2004; Post, Holsboer et Behl, 1998; Suzuki et Packer, 1993). Wadsworth, McDonald et Koop (2001) ont démontré, chez les macrophages RAW 264,7, que l'EGb 761 réduit l'activation du NF- κ B induite par les LPS.

L'EGb 761 est composé de plusieurs molécules et nous nous sommes intéressés au rôle de certaines d'entre elles dans la modulation de l'activité du NF- κ B. Les résultats présentés à la section 3.1.1 ont démontré que le ginkgolide B (BN52021) protège de la toxicité du β A mais il ne s'agit pas d'un mécanisme anti-fibrillaire. Dans le cas des flavonoïdes de l'EGb 761 (CP205), ce sont des antioxydants qui protègent de la toxicité du β A (Bastianetto et Quirion, 2002) et nous savons que le NF- κ B est régulé par le potentiel rédox intracellulaire (Behl *et al.*, 1994). Ces informations nous ont amené à étudier le rôle des flavonoïdes (CP205) et du ginkgolide B (BN52021) dans l'inhibition de l'activité du NF- κ B par l'EGb 761. Suite au traitement des cellules N2a avec CP205 ou BN52021, nous avons observé une diminution de l'I κ B β et une augmentation de p50 et p65 nucléaires (**figure 14**). Nous avons ici prouvé que ces sous-fractions sont des activateurs du NF- κ B. Wadsworth et Koop (1999) ont déjà démontré que la quercétine, un flavonoïde de l'EGb 761, augmente la liaison de p50/p65 à l'ADN sans toutefois augmenter la transcription de gènes et l'expression de protéines régulées par le NF- κ B comme le TNF- α et l'iNOS. Sachant que l'EGb 761 réduit l'activité du NF- κ B, d'autres composantes de cet extrait doivent avoir des effets compensatoires pour conférer à cet extrait son effet inhibiteur. La synergie des composantes de l'EGb 761 est donc importante dans l'effet inhibiteur de cet extrait sur le NF- κ B.

L'EGb 761 est reconnu pour protéger les cellules neuronales de la toxicité du β A, notamment par des mécanismes antioxydants (Bastianetto *et al.*, 2000; Bastianetto et Quirion, 2002; Smith et Luo, 2003). Le β A entraîne un stress oxydant dans le cerveau des patients atteints de la MA ce qui pourrait expliquer l'augmentation du NF- κ B, celui-ci étant sensible au potentiel rédox intracellulaire. Nous avons confirmé que le β A₂₅₋₃₅ à 100 μ g/mL (94,3 μ M) diminue la survie des cellules N2a (**figure 15**). Cette concentration toxique de peptide n'a pas d'effet sur l'activité du NF- κ B (**figure 16**). Ces résultats sont en accord avec les résultats de Kaltschmidt *et al.* (1997) qui ont montré que le β A₂₅₋₃₅, à

des concentrations de l'ordre du nanomolaire, induit l'activation du NF- κ B, ce qui est associé à un faible taux de mortalité cellulaire. Par contre, à des concentrations de l'ordre du micromolaire, le β A n'active pas le NF- κ B et le taux de mortalité cellulaire est très élevé. Nous avons précédemment démontré que l'EGB 761 diminue l'activité du NF- κ B. Or, le co-traitement des cellules N2a avec l'EGB 761 à 50 μ g/mL et β A₂₅₋₃₅ à 100 μ g/mL diminue de façon encore plus importante l'activité constitutive du NF- κ B que EGB 761 seul (**figure 16**). Il est possible que l'EGB 761 protège de la toxicité du β A₂₅₋₃₅ en diminuant l'activité du NF- κ B, ce qui pourrait causer une diminution de la transcription de certains gènes et de l'expression de certaines protéines pro-apoptotiques. La protection par l'EGB 761 contre la toxicité du β A est donc associée à une diminution de l'activation du NF- κ B.

Certaines études cliniques ont démontré que l'EGB 761 pourrait avoir un effet bénéfique chez les patients atteints de la MA (Hofferberth, 1994; Kanowski *et al.*, 1996; Le Bars *et al.*, 1997). Les multiples mécanismes d'action de cet extrait standardisé pourraient expliquer l'effet observé lors de ces études cliniques. D'une part, différents groupes de recherche ont démontré que l'EGB 761 est un antioxydant efficace (Bastianetto *et al.*, 2000; Bastianetto et Quirion, 2002; Smith et Luo, 2003) qui pourrait limiter les dommages causés par le stress oxydant observé dans la MA (Dei *et al.*, 2002; Hensley *et al.*, 1995; Lovell *et al.*, 1995; Nunomura *et al.*, 2004; Palmer et Burns, 1994; Pratico *et al.*, 2004; Ramassamy *et al.*, 1999; Ramassamy *et al.*, 2000; Shan, Tashiro et Glenn Lin, 2003; Subbarao *et al.*, 1990). D'autre part, les résultats présentés dans le cadre de ce projet de recherche démontrent que l'effet bénéfique de l'EGB 761 sur les patients atteints de la MA pourrait également être attribuable à son effet d'inhibition de la fibrillation du β A qui est nécessaire à l'activité neurotoxique de ce peptide (Pike *et al.*, 1991; Simmons *et al.*, 1994). De plus, nos résultats démontrent également que l'EGB 761 réduit l'activation du NF- κ B. Des études *post-mortem* montrent une activation du NF- κ B dans les astrocytes et les neurones situés autour des plaques séniles (Kaltschmidt *et al.*, 1997). Ce facteur de transcription nucléaire peut entraîner la transcription de gènes et l'expression de protéines pro-apoptotiques. L'effet inhibiteur de l'EGB 761 sur l'activité de ce facteur de transcription et sur la fibrillation du β A pourrait limiter la mort neuronale

observée dans le cerveau des patients atteints de la MA (Smale *et al.*, 1995) et entraîner un effet bénéfique chez ces personnes.

4.2 Potentiel neuroprotecteur et mécanismes de protection du tyrosol et de l'hydroxytyrosol contre la toxicité du peptide β -amyloïde.

4.2.1 Le tyrosol et l'hydroxytyrosol : protection des cellules N2a contre la toxicité du peptide β -amyloïde

Le tyrosol et l'OH-tyrosol sont des molécules qui se retrouvent en abondance dans l'huile d'olive, une composante importante de la diète méditerranéenne (Murkovic *et al.*, 2004; Owen *et al.*, 2000;). Cette diète est associée à la protection contre les déclin cognitifs reliés à l'âge, notamment la MA (Panza *et al.*, 2004). Parmi toutes les molécules qui composent la diète méditerranéenne, nous nous sommes intéressés à l'OH-tyrosol et au tyrosol parce que ces molécules ont un potentiel antioxydant qui pourrait protéger contre la toxicité du βA_{25-35} (Visioli et Galli, 1994; Visioli *et al.*, 1995; Leenen *et al.*, 2002; Marrugat *et al.*, 2004). Ce sont des composés phénoliques dont la structure se retrouvent dans les flavonoïdes. Rappelons que les flavonoïdes protègent contre la toxicité du βA (Bastianetto et Quirion, 2002). Avec les résultats présentés dans ce mémoire, nous démontrons effectivement que l'OH-tyrosol et le tyrosol protègent les cellules N2a contre la toxicité du βA_{25-35} . Nous nous attendions à ce que l'OH-tyrosol soit plus efficace que le tyrosol dans la protection contre le βA parce que la littérature démontre que l'OH-tyrosol est plus efficace que le tyrosol dans la protection contre la toxicité du H_2O_2 (Manna *et al.*, 1997; Owen *et al.*, 2000), un médiateur de la toxicité du βA . De façon surprenante, nos résultats démontrent que le tyrosol est plus efficace que l'OH-tyrosol dans la protection contre la toxicité du βA . Par le test de cytotoxicité LDH, nous avons observé que le tyrosol, à 50 et 100 μM , protège complètement les cellules N2a de la toxicité du βA_{25-35} à 150 $\mu g/mL$ (**figure 17**). Avec le test de survie cellulaire XTT, la protection a été observée seulement avec le tyrosol à 100 μM (**figure 18**). Les cellules N2a sont partiellement protégées de la toxicité du βA_{25-35} avec l'OH-tyrosol à 50

μM , ce que nous avons observé avec les tests LDH et XTT (**figures 19 et 20**). À $100 \mu\text{M}$, il n'y a pas de protection par l'OH-tyrosol.

4.2.2 Effet antioxydant : hydroxytyrosol, tyrosol et protection contre la toxicité du H_2O_2

Ayant observé que le tyrosol est plus efficace dans la protection contre la toxicité du βA , nous avons émis l'hypothèse que le pouvoir antioxydant n'est pas le mécanisme de protection impliqué. Effectivement, nous n'avons pas observé de protection par le tyrosol contre la toxicité du H_2O_2 sur les cellules N2a (**figures 22 et 23**). Ce résultat est en accord avec l'étude de Manna *et al.* (1997) qui ont démontré que le tyrosol ne protège pas de la toxicité du H_2O_2 . Il faut mentionner que la concentration de H_2O_2 utilisée est relativement élevée ($250 \mu\text{M}$) mais nécessaire pour induire une diminution de la survie des cellules N2a (**figure 21**). Ce résultat devrait être confirmé en utilisant un modèle cellulaire moins résistant qui permettrait d'utiliser une concentration de H_2O_2 moins élevée et diminuer le risque que le tyrosol soit complètement oxydé avant même d'avoir un effet sur les cellules. Une autre possibilité serait de traiter les cellules d'abord avec le tyrosol et ensuite avec le H_2O_2 pour évaluer son effet préventif. Dans le cas de l'OH-tyrosol, la concentration protectrice contre la toxicité du βA_{25-35} ($50 \mu\text{M}$) (**figures 19 et 20**) protège également de la toxicité du H_2O_2 ($250 \mu\text{M}$) (**figure 24**), suggérant que son effet antioxydant protège partiellement de la toxicité du βA . L'analyse des structures de l'OH-tyrosol et du tyrosol permet de comprendre pourquoi nous et d'autres ont observé que l'OH-tyrosol protège plus efficacement de la toxicité de ROS. Il semble que la présence de deux groupements hydroxyls en position ortho augmente le potentiel antioxydant d'une molécule. D'autres composés phénoliques di-hydroxylés en position ortho ont également démontré un pouvoir antioxydant plus puissant que leurs congénères ayant un seul groupement hydroxyl sur le cycle benzylique. C'est le cas notamment de l'acide p-coumarique et de l'acide caféique (Marinova et Yanishshlieva, 1996). Comme le βA a plusieurs mécanismes de toxicité, le potentiel antioxydant de l'OH-tyrosol ne serait pas suffisant pour apporter une protection complète aux cellules N2a contre le peptide toxique. De façon surprenante, l'utilisation de $100 \mu\text{M}$ d'OH-tyrosol ne protège pas contre la toxicité du H_2O_2 à $250 \mu\text{M}$ et 2 mM . Il est tout de même possible que le

tyrosol et l'OH-tyrosol aient la capacité de protéger les cellules par un mécanisme antioxydant. Ces composés pourraient intervenir dans les voies métaboliques conduisant à la formation de radicaux libres oxygénés et de H_2O_2 en prévenant, par exemple, la formation de O_2^- ou en le détachant. En effet, le H_2O_2 est un produit de dismutation de l'anion superoxyde. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en mesurant la capacité du tyrosol et de l'OH-tyrosol à piéger l'anion superoxyde généré par l'oxydation de la xanthine en urate par l'action de la xanthine oxydase. D'ailleurs, il a été démontré par Moreno (2003) que le tyrosol diminue la production de O_2^- et H_2O_2 par les macrophages RAW 264.7 stimulés au 12-myristate 13-acetate (PMA) et piège l'anion superoxyde généré par le système xanthine/xanthine oxydase.

4.2.3. Le potentiel anti-apoptotique du tyrosol et de l'hydroxytyrosol

Le tyrosol ne protège pas de la toxicité du H_2O_2 et son potentiel antioxydant est limité. Nous avons estimé que cette molécule devait protéger les cellules N2a de la toxicité du βA_{25-35} par un autre mécanisme. Un des mécanismes de toxicité du βA est l'induction de l'apoptose neuronale (Harada et Sugimoto, 1999; Lou *et al.*, 1993; Luo *et al.*, 2002; Marin *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001; Tamagno *et al.*, 2003). Ainsi, nous avons étudié l'effet du tyrosol sur l'apoptose induite par le βA_{25-35} par cytométrie en flux en utilisant l'annexine V-FITC pour détecter l'apoptose. Les résultats obtenus sont curieux (**figure 27**). En effet, le tyrosol seul à 50 μM entraîne plus d'apoptose que le niveau de base observé chez les cellules témoins. Par les tests XTT et LDH, la toxicité par le tyrosol à 50 μM n'a pas été détectée chez les cellules N2a. Ce résultat étrange n'est pas observé avec le tyrosol à 100 μM . Autres résultats étonnants: 50 μM de tyrosol protège de l'apoptose induite par le βA_{25-35} alors que 100 μM de tyrosol ne protège pas (**figure 27**). Toutefois, les tests XTT et LDH montrent une protection contre la toxicité du βA_{25-35} avec le tyrosol à 50 μM (LDH seulement, **figure 17**) et 100 μM (LDH et XTT, **figures 17 et 18**). Une équipe de recherche a démontré que le βA_{1-40} peut interagir directement avec les phosphatidylsérines de la membrane cytoplasmique (Lee, Pollard et Arispe, 2002). Or, la détection de l'apoptose par l'annexine V-FITC implique la liaison de l'annexine V aux phosphatidylsérines exposés à la surface des cellules. Si le βA_{25-35} se lie également aux phosphatidylsérines, il est possible que l'annexine V-FITC ne puisse plus s'y lier,

faussant les résultats obtenus par cytométrie en flux. Ce phénomène expliquerait également le faible déplacement de la cloche obtenu par cytométrie en flux lorsque les cellules sont traitées avec le βA_{25-35} , pourtant reconnu pour induire l'apoptose neuronale dans les conditions que nous avons utilisées.

4.2.4. Modulation du NF- κ B : activation par l'hydroxytyrosol

Nous avons étudié la modulation du NF- κ B, sensible au potentiel rédox intracellulaire, par le tyrosol et l'OH-tyrosol comme mécanisme possible de protection contre la toxicité du βA_{25-35} . Selon nos résultats, le traitement des cellules N2a avec le tyrosol seul ou le tyrosol et le βA n'a pas d'effet sur l'activité du NF- κ B (**figure 28**). La protection du tyrosol contre la toxicité du βA_{25-35} ne peut donc pas être associée à la modulation du NF- κ B. Nous avons observé une protection par l'OH-tyrosol 50 μ M contre la toxicité du H_2O_2 . Nous nous attendions donc à une modulation de l'activité du NF- κ B, particulièrement à 50 μ M. Effectivement, nous avons observé l'augmentation de p65 dans la fraction nucléaire des cellules N2a traitées avec l'OH-tyrosol à 50 μ M ou l'OH-tyrosol à 50 μ M et le βA_{25-35} , suggérant ainsi l'activation du NF- κ B (**figure 29**). Cette activation pourrait être associée à l'effet protecteur de l'OH-tyrosol contre la toxicité du βA_{25-35} . Il y a également une augmentation d'I κ B β dans la fraction cytoplasmique, ce qui pourrait être attribué à l'activation du NF- κ B, entraînant la resynthèse d'I κ B β (Suyang *et al.*, 1996). De plus, certains groupes de recherche ont observé l'activation du NF- κ B, notamment par la NGF, sans dégradation de la protéine inhibitrice I κ B α (Bui *et al.*, 2001; Jiménez *et al.*, 2000). L'OH-tyrosol à 100 μ M, qui ne protège pas de la toxicité du βA_{25-35} et du H_2O_2 et n'a pas d'effet sur le NF- κ B.

4.3 Implication du facteur de transcription nucléaire κ B dans la synthèse du peptide β -amyloïde.

La séquence κ B se retrouve sur le promoteur du gène du PPA, la protéine précurseur de l'amyloïde (Ghosh, May et Kopp, 1998). Nous avons postulé que chez les souris p50 $-/-$, la production d'amyloïde serait réduite. Nos résultats démontrent pourtant

qu'il y a plus de βA_{1-40} et de βA_{1-42} dans certaines structures du cerveau des souris p50 -/- que chez les souris sauvages (**figures 30 et 31**). Dans un cadre général, il y a plus de synthèse de βA_{1-42} que de βA_{1-40} , autant chez les souris sauvages que chez les souris p50 -/-. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Beffert *et al.* (1999) qui ont démontré, sur des tissus en *postmortem* qu'il y a plus de βA_{1-42} que de βA_{1-40} dans le cerveau, autant chez les sujets sans démences que chez les sujets ayant eux la MA. Ensuite le βA_{1-40} est plus élevé chez les souris p50 -/- que chez les souris sauvages dans le striatum, l'hippocampe et le cortex temporal. Le βA_{1-42} est augmenté dans le cortex temporal. L'hippocampe et le cortex temporal sont des régions du cerveau qui sont particulièrement affectées dans la MA et où il y a accumulation importante de βA . Ces résultats suggèrent que le p50 a un rôle à jouer pour contrôler les niveaux de βA dans le cerveau des patients atteints de la MA. L'activation du NF- κ B pourrait avoir un rôle modérateur dans la synthèse de ce peptide toxique. Ces résultats démontrent aussi que l'inhibition de la synthèse de l'APP, en inhibant le NF- κ B par exemple, n'entraîne pas nécessairement une diminution de la synthèse du βA .

4.4 Les techniques utilisées

Dans le cadre de ce projet de recherche, plusieurs techniques de laboratoires ont été utilisées. Chacune de ces méthodes présentent certains avantages et inconvénients dont je vais discuter ici. Également, quelques alternatives ou tests complémentaires sont proposés pour pallier aux problèmes et inconvénients de certaines méthodes et pour confirmer certains résultats.

4.4.1 Toxicologie *in vitro*: LDH et XTT

Les tests toxicologique *in vitro* que nous avons utilisé mesurent des paramètres différents ce qui peut expliquer la variabilité de certains résultats présentés dans ce mémoire. Le test de survie cellulaire XTT mesure la capacité des cellules à convertir les sels de tétrazolium en formazan par l'action des déshydrogénases mitochondriales. Lorsque la viabilité et l'activité mitochondriale d'une cellule diminuent, la conversion des

sels de tétrazolium en formazan décline. Le test de mortalité cellulaire LDH mesure l'activité de la lactate déshydrogénase cytoplasmique libérée dans le milieu de culture lorsque les cellules sont endommagées. Le résultat obtenu reflète l'intégrité de la membrane cellulaire. Certaines études ont démontré que la toxicité mesurée à l'aide des tests toxicologiques in vitro est dépendante du composé à l'étude et de sa concentration, du type cellulaire et de la durée du traitement. Par exemple, Fotakis et Timbrell (2006) ont observé, sur des lignées d'hépatocyte, qu'une concentration plus élevée de chlorure de cadmium ou alors un temps de traitement plus long est nécessaire pour détecter la toxicité de ce composé par le test LDH comparativement au test MTT. Comme le test XTT, le test MTT mesure la survie cellulaire via l'activité des déshydrogénases mitochondriales. Sur les fibroblastes L(tk-), Weyermann et al. (2005) ont observé des différences majeures dans les valeurs de EC_{50} de deux agents cytotoxiques, la choroquine et le sodium azide, selon les tests toxicologiques utilisés. Dans le cas de la choroquine, les valeurs de EC_{50} sont de 200 mM par le test LDH et 10 mM par le test MTT. Dans le cas du sodium azide, les valeurs de EC_{50} sont de 1 M par le test LDH et 300 mM par le test MTT. De plus, les tests LDH et XTT sont dépendants de réactions enzymatiques qui peuvent être influencés par l'effet des substances à l'étude sur les enzymes impliquées. Dans le cas du test LDH, une diminution de la synthèse de LDH et la dégradation du la LDH dans le milieu extracellulaire peuvent influencer les résultats de toxicité obtenus avec ce test pour des incubations de plus de trois heures (Putnam, Bombick et Doolittle, 2002). D'autres tests de toxicologie in vitro peuvent être utilisés pour éclaircir certains résultats contradictoires obtenus par les tests LDH et XTT. La méthode au rouge neutre, développée par Borenfreund et Puerner (1985), est une méthode intéressante. Les cellules viables vont prendre le colorant rouge neutre par transport actif et l'incorporer dans les lysosomes alors que les cellules non viables ne vont pas incorporer le colorant. Les cellules sont ensuite lavées et le colorant incorporé est libéré par une solution acide contenant de l'éthanol. L'intensité de la coloration est mesurée à 540 nm. Un des avantages de cette technique c'est l'absence de réaction enzymatique qui peut être influencé par les substances à l'étude.

4.4.2 Immunobuvardage et activation du NF- κ B

Lors de cette étude, nous avons utilisé la méthode d'immunobuvardage pour étudier la régulation du NF- κ B. Plusieurs autres méthodes existent et pourraient être utilisées pour confirmer les résultats obtenus lors de cette étude. Une méthode intéressante pour l'étude de la régulation du NF- κ B est l'EMSA ("Electrophoretic Mobility Shift Assay"). Tout comme pour l'immunobuvardage, les protéines cytoplasmiques et nucléaires doivent être séparées. Les protéines sont ensuite incubées avec une sonde d'ADN marqué au P^{32} qui contient la séquence κ B. NF- κ B (p50, p65) se fixera alors à cette séquence d'ADN. Suivant une électrophorèse et révélation par la radioactivité, nous pourrions observer que l'ADN sur laquelle NF- κ B se sera fixée migrera moins loin que l'ADN seule. Plus il y a de NF- κ B dans le cytoplasme ou le noyau, plus le signal de l'ADN "migrant moins loin" sera intense. Une autre méthode intéressante est l'immunofluorescence. Cette méthode a l'avantage de ne pas nécessiter la séparation des protéines cytoplasmiques et nucléaires, ce qui peut toujours être une source d'erreur.

4.4.3 Détection de l'apoptose : annexin V

Pour détecter le potentiel neuroprotecteur du tyrosol contre l'apoptose induite par le β A, nous avons utilisé l'annexin V. Sur les cellules en apoptose, cette molécule se lie aux phosphatidylsérines exposées à la surface de la membrane plasmique. L'annexin V, couplée au FITC, a été détectée par cytométrie en flux. Comme mentionné à la section 4.2.3, il est possible que le β A entrave la liaison de l'annexin V au phosphatidylsérine (Lee, Pollard et Arispe, 2002), ce qui peut avoir faussé les résultats. La méthode du TUNEL ("TdT-mediated dUTP nick end labeling") est une autre méthode intéressante pour détecter l'apoptose par cytométrie en flux ou par microscopie. Pendant le processus d'apoptose, l'ADN génomique est clivée, créant ainsi des fragments d'ADN double brin de faible poids moléculaire ainsi que des bouts d'ADN simple brin à l'extrémité de l'ADN de poids moléculaire élevé. Ces bouts d'ADN simple brin peuvent être identifiés en marquant les extrémités 3'-OH par une réaction enzymatique avec des nucléotides modifiés. Les bouts d'ADN simple brin sont marqués par l'action de la déoxynucléotidyl

terminal transférase (TdT) qui catalyze la polymérisation de nucléotides aux extrémités 3'-OH libres. Les nucléotides ajoutés étant couplés à la fluorescéine, la fragmentation de l'ADN peut ainsi être détectée par microscopie ou par cytométrie en flux (Gavrieli, Sherman et Ben-Sasson, 1992).

CONCLUSION

Dans le cadre de ce projet de recherche, nous nous étions fixés quatre objectifs. Notre premier objectif était d'étudier l'implication des flavonoïdes et du ginkgolide B dans l'inhibition de la fibrillation du β A par l'EGb 761. Notre second objectif était de déterminer l'effet neuroprotecteur du tyrosol et de l'OH-tyrosol, deux molécules antioxydantes de l'huile d'olive, contre la toxicité du β A et d'étudier divers mécanismes de protection. Notre troisième objectif était d'étudier l'effet de l'EGb 761 et de ses sous-fractions, du tyrosol et de l'OH-tyrosol sur l'activité de ce facteur de transcription dans la protection contre le β A. Finalement, nous nous sommes intéressés à l'implication du NF- κ B dans la synthèse du β A.

Nos résultats ont démontré que les flavonoïdes (CP205) inhibent complètement la fibrillation du β A₁₋₄₀, suggérant que cette sous-fraction joue un rôle important dans ce mécanisme de protection par l'EGb 761 contre la toxicité du β A. Nous avons également démontré que l'EGb 761 réduit l'activité du NF- κ B, un facteur de transcription qui régule la transcription de gènes pro et anti-apoptotiques. À un niveau fondamental, ces résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets bénéfiques de cet extrait standardisé sur la MA. L'augmentation de l'activité du NF- κ B par certaines sous-fractions de l'EGb 761 alors que l'EGb 761 réduit cette activité permet de conclure que les effets bénéfiques de l'extrait standardisé ne peuvent pas être attribuables à un seul composé mais à l'interaction de l'ensemble de ceux-ci.

Nous pouvons conclure que le tyrosol et l'OH-tyrosol protègent de la toxicité du β A. Ces résultats sont très intéressants, permettant d'identifier certaines molécules actives de la diète méditerranéenne dans la protection contre la MA. Ces résultats permettent d'envisager la création d'aliments à valeur ajoutée, contenant ces molécules, dans le but de prévenir ou de réduire les risques de MA. Alors que le(s) mécanisme(s) de protection par le tyrosol contre la toxicité du β A n'ont pas été identifiés, la protection par l'OH-

tyrosol est associée à un mécanisme antioxydant et à l'activation du NF- κ B. La modulation du NF- κ B par les différentes molécules à l'étude confirme que celle-ci dépend du stimulus et que l'activation autant que l'inhibition peuvent être associées à la protection des cellules neuronales contre un même agent toxique.

Notre étude sur les souris p50 $-/-$ a permis de démontrer que cette sous-unités est importante pour réguler la synthèse du β A. Les souris p50 $-/-$ ont plus de β A dans certaines structures cérébrales comparativement aux souris sauvages. Nos résultats suggèrent que l'activation du NF- κ B serait un mécanisme compensatoire pour contrôler ou diminuer la synthèse et l'accumulation de β A.

PERSPECTIVES

Évidemment, certains résultats doivent être approfondie alors que d'autres soulèvent plusieurs questions auxquelles il serait intéressant de répondre. Par exemple, l'étude de la transcription des gènes et l'expression des protéines qui sont modifiées lorsque l'activité du NF- κ B est réduite par l'EGB 761 serait très intéressante. Il est possible que certaines protéines pro-apoptotiques soient sous-exprimées suivant la modulation du NF- κ B par l'EGB 761. De même, l'étude de la transcription des gènes et l'expression des protéines qui sont modifiées lorsque l'activité du NF- κ B est augmentée par l'OH-tyrosol serait appropriée. Ici, l'expression de certaines protéines anti-apoptotiques pourraient être favorisée suivant la modulation du NF- κ B par l'OH-tyrosol. Une étude sur la relation structure-activité des antioxydants sur le NF- κ B serait intéressante. Évidemment, le(s) mécanisme(s) de protection par le tyrosol reste toujours à découvrir. Finalement, l'étude du lien entre la sous-unité p50 du NF- κ B et la synthèse du β A ferait un projet de recherche fort captivant.

LISTE DES RÉFÉRENCES

ANDRADE, P.B., B.M. Oliveira, R.M. Seabra, M.A. Ferreira, F. Ferreres et C. Garcia-Viguera. 2001. « Analysis of phenolic compounds in Spanish Albarino and Portuguese Alvarinho and Loureiro wines by capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography. » Electrophoresis, vol. 22, no. 8, mai, p. 1568-1572.

BASTIANETTO, S., C. Ramassamy, S. Doré, Y. Christen, J. Poirier et R. Quirion. 2000. « The ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by β -amyloid. » European Journal of Neuroscience, vol. 12, no. 6, juin, p. 1882-1890.

BASTIANETTO, S. et R. Quirion. 2002. « Natural extract as possible protective agents of brain aging. » Neurobiology of Aging, vol. 23, no. 5, septembre-octobre, p. 891-897.

BATE, C., M. Salmons et A. Williams. 2004. « Ginkgolide B inhibits the neurotoxicity of prions or amyloid- β_{1-42} . » Journal of Neuroinflammation, vol. 1, no. 4, mai, p. 1-8.

BEFFERT, U., J.S. Cohn, C. Petit-Turcotte, M. Tremblay, N. Aumont, C. Ramassamy, J. Davignon et J. Poirier. 1999. « Apolipoprotein E and β -amyloid levels in the hippocampus and frontal cortex of Alzheimer's disease subjects are disease-related and apolipoprotein E genotype dependant. » Brain Research, vol. 843, no. 1-2, octobre, p. 87-94.

BEG, A.A., P. Finco, P.V. Nantermet et A.S. Baldwin. 1993. « Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I κ B α : a mechanism for NF- κ B activation. » Molecular and Cellular Biology, vol. 13, no. 6, juin, p.3301-3310.

BEG, A.A., W.C. Sha, R.T. Bronson, S. Ghosh et D. Baltimore. 1995. « Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. » Nature, vol. 376, no. 6536, juillet, p.167-170.

BEHL, C., J.B. Davis, R. Lesley et D. Schubert. 1994. « Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. » Cell, vol. 77, no. 6, juin, p.817-827.

BEHL C. 1999. « Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. » Progress in Neurobiology, vol. 57, no. 3, février, p.301-323.

BEHL, C. 2000. « Vitamin E protects neurons against oxidative cell death in vitro more effectively than 17- β estradiol and induces the activity of the transcription factor NF- κ B. » Journal of Neural Transmission, vol. 107, no. 4, avril, p 393-407.

BIRKS J. 2006. « Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. » The Cochrane Library, vol. 2, janvier, p. 1-76.

BLACKER D. et R.E. Tanzi. 1998. « The genetics of Alzheimer disease. » Archive of neurology, vol. 55, no. 3, mars, p.294-296.

BORENFREUND, E. et J. Peurner. 1985. « Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. » Toxicology Letters, vol. 24, no. 2-3, février-mars, p. 119-124.

BRAAK, H. et E. Braak. 1991. « Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. » Brain Pathology, vol. 1, no. 3, avril, p. 213-216.

BROWN, K., S. Park, T. Kanno, G. Franzoso et U. Siebenlist. 1993. « Mutual regulation of the transcriptional activator NF- κ B and its inhibitor, I κ B- α . » Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 90, mars, p. 2532-2536.

BUI, N.T., A. Livolsi, J.-F. Peyron et J.H.M. Prehn. 2001. « Activation of nuclear factor κ B and bcl-x survival gene expression by nerve growth factor requires tyrosine phosphorylation of I κ B α . » The Journal of Cell Biology, vol. 152, no. 4, février, p. 753-763.

BUTTERFIELD, D.A., K. Hensley, M. Harris, M. Mattson et J.Carney. 1994. « β -amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease.» Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 200, no. 2, avril, p. 710-715.

CAMPION D., C. Dumanchin, D. Hannequin, B. Dubois, S. Belliard, M. Puel, C. Thomas-Anterion, A. Michon, C. Martin, F. Charbonnier, G. Raux, A. Camuzat, C. Penet, V. Mesnage, M. Martinez, F. Clerget-Darpoux, A. Brice et T. Frebourg. 1999. « Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease : prevalence, genetic, heterogeneity, and mutation spectrum. » American Journal of Human Genetic, vol. 65, p. 664-670.

CANADIAN STUDY OF HEALTH AND AGING WORKING GROUP. 1994. « Study methods and prevalence of dementia. » Canadian Medical Association Journal, vol. 150, no. 6, mars, p.899-913.

CANADIAN STUDY OF HEALTH AND AGING WORKING GROUP. 2000. « The incidence of dementia in Canada. » Neurology, vol. 55, no. 1, juillet, p.66-73.

CARTER, B.D., C. Kaltschmidt, B. Kaltschmidt, N. Offenhauser, R. Bohm-Matthaei, P.A. Baeuerle et Y.A. Barde. 1996. « Selective activation of NF-kappa B by nerve factor through the neurotrophin receptor p75. » Science, vol. 272, no. 5261, avril, p. 506-507.

CHAMKHA, M., B. Cathala, V. Cheynier et R. Douillard. 2003. « Phenolic composition of Champagnes from Chardonnay and Pinot Noir vintages. » Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 51, p. 3179-3184.

CHARTIER-HARLIN M.C., F. Crawford, H. Houlden, A. Warren, D. Hughes, L. Fidani, A. Goate, M. Rossor, P. Roques, J. Hardy, *et al.* 1991. « Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. » Nature, vol. 353, no. 6347, octobre, p.844-846.

CHEN, G., J. Cizeau, C.V. Velde, J.H. Park, G. Bozek, J. Bolton, L. Shi, D. Dubik et A. Greenberg. 1999. « Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins. » The Journal of Biological Chemistry, vol. 274, no. 1, janvier, p. 7-10.

CHEN, Z., J. Hagler, V. Palombello, F. Melandri, D. Scherer, D. Ballard et T. Maniatis. 1995. « Signal-induced site-specific phosphorylation targets I κ B α to the ubiquitination-protease pathway. » Genes & Development, vol. 9, p. 1586-1597.

COLLART, M.A., P. Baeuerle et P. Vassalli. 1990. « Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages : involvement of four κ B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF- κ B. » Molecular and Cellular Biology, vol. 10, no. 4, avril, p. 1498-1506.

DAS, K.C., Y. Lewis-Molock et C.W. White. 1995. « Thiol modulation of the TNF alpha and IL-4 induced MnSOD gene expression and activation of NF-kappa B. » Molecular and Cellular Biochemistry, vol. 148, no. 1, juillet, p. 45-57.

DEFEUDIS, F.V. 1998. Ginkgo biloba extract (EGb 761). From chemistry to the clinic. Wiesbaden: Ullstein Medical.

DEI R., A. Takeda, H. Niwa, M. Li, Y. Nakagomi, M. Watanabe, T. Inagaki, Y. Washimi, Y. Yasuda, K. Horie, T. Miyata et G. Sobue. 2002. « Lipid peroxidation and advanced glycation end products in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease. » Acta Neuropathologica, vol. 104, p.113-122.

DIDONATO, J., F. Mercurio et M. Karin. 1995. « Phosphorylation of I κ B α precedes but is not sufficient for its dissociation from NF- κ B. » Molecular and Cellular Biology, vol. 15, p. 1302-1311.

DIDONATO, J.A., M. Hayakawa, D.M. Rothwarf, E. Zandi et M. Karin. 1997. « A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. » Nature, vol.388, août, p.548-554.

ELLIS, J.M. 2005. « Cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. » The Journal of the American Osteopathic Association, vol. 105, no. 3, mars, p. 145-158.

FOTAKIS, G. et J.A. Timbrell. 2006. « In vitro cytotoxicity assays : comparaison of the LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. » Toxicology Letters, vol. 160, no. 2, janvier, p. 171-177.

GAVRIELI, Y., Y. Sherman et S.A. Ben-Sasson. 1992. « Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. » The Journal of Cell Biology, vol. 119, no. 3, novembre, p. 493-501.

GERVAIS, F.G., D. Xu, G.S. Robertson, J.P. Vaillancourt, Y. Zhu, J.Q. Huang, A. LeBlanc, D. Smith, M. Rigby, M.S. Shearman, E.E. Clarke, H. Zheng, L.H.T. Van Der Ploeg, S.C. Ruffolo, N.A. Thornberry, S. Xanthoudakis, R.J. Zamboni, S. Roy et D.W. Nicholson. 1999. « Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid- β precursor protein and amyloidogenic A β peptide formation. » Cell, vol. 97, avril, p.395-406.

GEULA, C., C.K. Wu, D. Saroff, A. Lorenzo, M. Yuan et B.A. Yankner. 1998. « Aging renders the brain vulnerable to amyloid β -protein neurotoxicity. » Nature Medicine, vol. 4, no. 7, juillet, p. 827-831.

GHOSH, S., M.J. May et E.B. Kopp. 1998. « NF- κ B and Rel proteins : evolutionarily conserved mediators of immune responses. » Annual Review of Immunology, vol. 16, p.225-260.

GLENNER, G.G. et C.W. Wong. 1984. « Alzheimer's disease : initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. » Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 120, no. 3, mai, p.885-890.

GOATE A., M.C. Chartier-Harlin, M. Mullen, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James, *et al.* 1991. « Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. » Nature, vol. 349, no. 6311, février, p.704-706.

GOLDGABER, D., M.I. Lerman, O.W. McBride, U. Saffiotti et D.C. Gajdusek. 1987. « Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. » Science, vol. 235, février, p. 877-880.

GRAVINA, S.A., L. Ho, C.B. Eckman, K.E. Long, L. Otvos, Jr., L.H. Younkin, N. Suzuki et S.G. Younkin. 1995. « Amyloid β protein ($A\beta$) in Alzheimer's disease brain. » The Journal of Biological Chemistry, vol. 270, no. 13, mars, p.7013-7016.

GREENE, L.A. et A.S. Tischler. 1976. « Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. » Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 73, no. 7, juillet, p.2424-2438.

GRILLI, M., Ribola, M., Alberici, A., Valerio, A., Memo, M. et Spano, P.F. 1995. « Identification and characterization of a κB /Rel binding site in the regulatory region of the amyloid precursor protein gene. » The Journal of Biological Chemistry, vol. 270, no. 45, novembre, p. 26 774-26 777.

GRILLI, M., F. Goffi, M. Memo et P.-F. Spano. 1996. « Interleukin- 1β and glutamate activate the NF- κB /Rel binding site from the regulatory region of the amyloid precursor protein gene in primary neuronal cultures. » The Journal of Biological Chemistry, vol. 271, no. 25, juin, p. 15002-15007.

GRUMONT, R.J., I.J. Rourke et S. Gerondakis. 1999. « Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. » Genes & Development, vol. 13, p. 400-411.

GUO, Q., N. Robinson et M.P. Mattson. 1998. « Secreted β -amyloid precursor protein counteracts the proapoptotic action of mutant presenilin-1 by activation of NF- κB

and stabilization of calcium homeostasis. » The Journal of Biological Chemistry, vol. 273, no. 20, mai, p. 12341-12351.

HARADA, J. et M. Sugimoto. 1999. « Activation of caspase-3 in β -amyloid-induced apoptosis of cultured rat cortical neurons. » Brain Research, vol. 842, p.311-323.

HARRIS, M.E., K. Hensley, D.A. Butterfield, R.A. Leedle et J.M. Carney. 1995. « Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's β -amyloid peptide (1-40) in cultured hippocampal neurons. » Experimental Neurology, vol. 131, p.193-202.

HASKILL, S., A.A.Beg, S.M. Tompkins, J.S. Morris, A.D. Yurochko, A. Sampson-Johannes, K. Mondal, P. Ralph et A.S. Baldwin, Jr. 1991. « Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity. » Cell, vol. 65, no. 7, juin, p. 281-289.

HAXBY, J.V., K. Raffaele, J. Gillette, M.B. Schapiro et S.I. Rapoport. 1992. « Individual trajectories of cognitive decline in patients with dementia of the Alzheimer type. » Journal of Clinical Experimental Neuropsychology, vol. 14, no. 4, juillet, p. 575-592.

HECK, S., F. Lezoualc'h, S. Engert et C. Behl. 1999. « Insulin-like growth factor-1-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor κ B. » The Journal of Biological Chemistry, vol. 274, no. 14, avril, p. 9828-9835.

HENSLEY, K., J.M. Carney, M.P. Mattson, M. Aksenova, M. Harris, J.F. Wu, R.A. Floyd et D.A. Butterfield. 1994. « A model for β -amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. » Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 91, avril, p.3270-3274.

HENSLEY, K., N. Hall, R. Subramaniam, P. Cole, M. Harris, M. Aksenov, M. Aksenova, S. Prasad Gabbita, J.F. Wu, J.M. Carney, M. Lovell, W.R. Markesbery et D.A. Butterfield. 1995. « Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. » Journal of Neurochemistry, vol. 65, p.2146-2156.

HOFFERBERTH, B. 1994. « The efficacy of EGb 761 in patients with senile dementia of the Alzheimer type, a double-blind, placebo-controlled study on different levels of investigation. » Human Psychopharmacology, vol. 9, p. 215-222.

HUX M.J., B.J. O'Brien, M. Iskedjian, R. Goeree, M. Gagnon et S. Gauthier. 1998. « Relation between severity of Alzheimer's disease and costs of caring ». Canadian Medecine Association Journal, vol. 159, no. 5, septembre, p.457-465.

HYMAN, B.T., G.W. Van Hoesen, A.R. Damasio et C.L. Barnes. 1984. « Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. » Science, vol. 225, no. 4667, septembre, p. 1168-1170.

HYMAN, B.T., G.W. Van Hoesen et A.R. Damasio. 1990. « Memory-related systems in Alzheimer's disease: an anatomic study. » Neurology, vol. 40, no. 11, novembre, p. 1721-1730.

IVANOV, V.N., G. Deng, E.R. Podack et T.R. Malek. 1995. « Pleiotropic effects of Bcl-2 on transcription factors in T cells: potential role of NF-kappa B p50-p50 for the anti-apoptotic function of Bcl-2. » International Immunology, vol. 7, no. 11, novembre, p. 1709-1720.

IWATSUBO T., A. Odaka, N. Suzuki, H. Mizusawa, N. Nukina et Y. Ihara. 1994. « Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). » Neuron, vol. 13, no. 1, juillet, p.45-53.

JANG, J.-H. et Y.-J. Surh. 2003. « Protective effect of resveratrol on β -amyloid-induced oxidative PC12 cell death. » Free Radical Biology & Medecine, vol. 34, no. 8, p. 1100-1110.

JARRETT J.T., E.P. Berger et P.T. Lansbury, Jr. 1993. « The carboxy terminus of the β amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implication for the pathogenesis of Alzheimer's disease. » Biochemistry, vol. 32, no. 18, mai, p.4695-4697.

JIMÉNEZ, L.A., J. Thompson, D.A. Brown, I. Rahman, F. Antonicelli, R. Duffin, E.M. Drost, R.T. Hay, K. Donaldson et W. MacNee. 2000. « Activation of NF- κ B by PM₁₀ occurs via an iron-mediated mechanism in the absence of I κ B degradation. » Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 166, p. 101-110.

KALTSCHMIDT, B., M. Uherek, B. Volk, P.A. Baeuerle et C. Kaltschmidt. 1997. « Transcription factor NF- κ B is activated in primary neurons by amyloid β peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease.» Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 94, mars, p. 2642-2647.

KANG, J., H.G. Lemaire, A. Unterbeck, J.M. Salbaum, C.L. Masters, K.H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther et B. Muller-Hill. 1987. « The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. » Nature, vol. 325, février, p. 733-736.

KANOWSKI, S., W.M. Hermann, K. Stephan, W. Wierich et R. Hörr. 1996. « Proof of efficacy of the ginkgo biloba special extract EGb 761 in outpatients suffering from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi-infarct dementia. » Pharmacopsychiatry, vol. 29, p. 47-56.

KEMLER, I. Et A. Fontana. 1999. « Role of I κ B α and I κ B β in the biphasic nuclear translocation of the NF- κ B in TNF α -stimulated astrocytes and in neuroblastoma cells. » Glia, vol. 26, p. 212-220.

KIRSCHNER D.A., C. Abraham et D.J. Selkoe. 1986. « X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross- β conformation.» Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 83, janvier, p.503-507.

KOJIMA, N., N. Kurosawa, T. Nishi, N. Hanai et S. Tsuji. 1994. « Induction of cholinergic differentiation with neurite sprouting by *de novo* biosynthesis and expression of GD3 and b-series gangliosides in neuro2a cells. » The Journal of Biological Chemistry, vol. 269, no. 48, décembre, p. 30451-30456.

KOVACS, A.D., S. Chakraborty-Sett, S.H. Ramirez, L.F. Sniderhan, A.L. Williamson et S.B. Maggiwar. 2004. « Mechanism of NF- κ B inactivation induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons.» European Journal of Neuroscience, vol. 20, p.345-352.

KOWALL, N.W., A.C. McKee, B.A. Yankner et M.F. Beal. 1992. « In vivo neurotoxicity of beta-amyloid [beta(1-40)] and the beta(25-35) fragment. » Neurobiology of Aging, vol. 13, no. 5, septembre, p.537-542.

KRUMAN, I., A.J. Bruce-Keller, D. Bredesen, G. Waeg et M.P. Mattson. 1997. « Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. » The Journal of Neuroscience, vol. 17, no. 13, juillet, p. 5089-5100.

LAMBERT, M.P., A.K. Barlow, B.A. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T.E. Morgan, I. Rozovsky, B. Trommer, K.L. Viola, P. Wals, C. Zhang, C.E. Finch, G.A. Krafft et W.L. Klein. 1998. « Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β_{1-42} are potent central nervous system neurotoxins. » Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 95, mai, p. 6448-6453.

LE BAIL, O., R. Schmidt-Ullrich et A. Israël. 1993. « Promoter analysis of the gene encoding the I κ B- α /MAD3 inhibitor of NF- κ B: positive regulation by members of the rel/NF- κ B family. » The EMBO Journal, vol. 12, no. 12, p.5043-5049.

LE BARS, P.L., M.M. Katz, N. Berman, T.M. Itil, A.M. Freedman et A.F. Schatzberg. 1996. « A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of ginkgo biloba for dementia. » Journal of the American Medical Association, vol. 278, p. 1327-1332.

LEE, G., Pollard, H.B. et Arispe, N. 2002. « AnnexinV and apolipoprotein E2 protect against Alzheimer's amyloid- β -peptide cytotoxicity by competitive inhibition at a common phosphatidylserine interaction site. » Peptides, vol. 23, p.1249-1263.

LEE, R.-M., G. Gillet, J. Burnside, S. J. Thomas et P. Neiman. 1999. « Role of Nr13 in regulation of programmed cell death in the bursa of Fabricius. » Genes & Development, vol. 13, p. 718-728.

LEENEN, R., A.J.C. Roodenburg, M.N. Vissers, J.A.E. Schuurbijs, K.P.A.M. van Putte, S.A. Wiseman et F.H.M.M. van de Put. 2002. « Supplementation of plasma with olive oil phenols and extracts: influence on LDL oxidation. » Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 50, p.1290-1297. <

LEVINE III, H. et J.D. Scholten. 1999. « Screening for pharmacologic inhibitors of amyloid fibril formation. » Methods in Enzymology, vol. 309, p. 467-476.

LEZOUALC'H, F., Y. Sagara, F. Holsboer et C. Behl. 1998. « High constitutive NF- κ B activity mediates resistance to oxidative stress in neuronal cells. » The Journal of Neuroscience, vol. 18, no. 9, mai, p. 3224-3232.

LIBERMANN, T.A. et D. Baltimore. 1990. « Activation of interleukin-6 gene expression through the NF- κ B transcription factor. » Molecular and Cellular Biology, vol. 10, no. 5, mai, p. 2327-2334.

LOO, D.T., A. Copani, C.J. Pike, E.R. Whittemore, A.J. Walencewicz et C.W. Cotman. 1993. « Apoptosis is induced by β -amyloid in cultured central nervous system neurons. » Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 90, septembre, p. 7951-7955.

LORENZO A. et B.A. Yankner. 1994. « β -amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. » Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 91, décembre, p.12243-12247.

LOVELL M.A., W.D. Ehmann, S.M. Butler et W.R. Markesbery. 1995. « Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. » Neurology, vol. 45, no. 8, août, p.1594-1601.

LOVELL, M.A., C. Xie, S.P. Gabhita et W.R. Markesbery. 2000. « Decreased thioredoxin and increased thioredoxin reductase levels in Alzheimer's disease brain. » Free Radical Biology & Medicine, vol. 28, no. 3, p. 418-427.

LUO, Y., J.V. Smith, V. Paramasivam, A. Burdick, K.J. Curry, J.P. Buford, I. Khan, W.J. Netzer, H. Xu et P. Butko. 2002. « Inhibition of amyloid- β aggregation and caspase-3 activation by the *Ginkgo biloba* extract EGb 761. » Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 99, no. 19, septembre, p.12197-12202.

MAGGIRWAR, S.B., P.D. Sarmiere, S. Dewhurst et R.S. Freeman. 1998. « Nerve growth factor-dependent activation of NF- κ B contributes to survival of sympathetic neurons. » The Journal of Neuroscience, vol. 18, no. 24, décembre, p. 10356-10365.

MANN, D.M., D. Prinia, C.A. Davies, Y. Ihara, A. Delacourte, A. Defossez, R.J. Mayer et M. Landon. 1989. « Immunocytochemical profile of neurofibrillary tangles in Down's syndrome patients of different ages. » Journal of Neurological science, vol. 92, no. 2-3, septembre, p. 247-260.

MANNA, C., P. Galletti, V. Cucciolla, O. Molledo, A. Leone et V. Zappia. 1997. « The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. » Journal of Nutrition, vol. 127, p. 286-292.

MARÍN, N., B. Romero, F. Bosch-Morell, M. Llansola, V. Felipo, J. Romà et F.J. Romero. 2000. « β -amyloid-induced activation of caspase-3 in primary cultures of rat neurons. » Mechanisms of Ageing and Development, vol. 119, p.63-67.

MARINOVA, E.M. et N.V. Yanishlieva. 1996. « Antioxydative activity of phenolic acids on triacylglycerols and fatty acid methyl esters from olive oil. » Food Chemistry, vol. 56, no. 2, p.139-145.

MARRUGAT, J., M.-I. Covas, M. Fitò, H. Schröder, E. Mirò-Casas, E. Gimeno, M.C. Lopez-Sabater, R. de la Torre et M. Farré. 2004. « Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation. » European Journal of Nutrition, vol. 43, p.140-147.

MATTSON, M.P., Y. Goodman, H. Luo, W. Fu et K. Furukawa. 1997. « Activation of NF- κ B protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. » Journal of Neuroscience Research, vol. 49, p. 681-697.

McKEE, A.C., N.W. Kowall, S. Schumacher et M.F. Beal. 1998. « The neurotoxicity of amyloid beta protein in aged primates. » Amyloid, vol. 5, no. 1, mars, p. 1-9.

MEGA, M.S., J.L. Cummings, T. Fiorello et J. Gombein. 1996. « The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's disease. » Neurology, vol. 46, no. 1, janvier, p.130-135.

MERCURIO, F., H. Zhu, B.W. Murray, A. Shevchenko, B.L. Bennett, J. W. Li, D.B. Young, M. Barbosa et M. Mann. 1997. « IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. » Science, vol.278, octobre, p.860-866.

MERZ P.A., H.M. Wisniewski, R.A. Somerville, S.A. Bobin, C.L. Masters et K. Iqbal. 1983. « Ultrastructural morphology of amyloid fibrils from neuritic and amyloid plaques ». Acta Neuropathologica, vol. 60, no. 1-2, p.113-124.

MOREIRA, A.J., C. Fraga, M. Alonso, P.S. Collado, C. Zetler, C. Marroni, N. Marroni et J. Gonzalez-Gallego. 2004. « Quercetin prevents oxidative stress and NF- κ B activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. » Biochemical Pharmacology, vol. 68, p.1939-1946.

MORENO, J.J. 2003. « Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. » Free Radical Biology & Medicine, vol. 35, no. 9, p. 1073-1081.

MURKOVIC, M., S. Lechner, A. Pietzka, M. Bratacos et E. Katzogiannos. 2004. « Analysis of minor components in olive oil. » Journal of Biochemical and Biophysical Methods, vol. 61, p. 155-160.

MURRELL J., M. Farlow, B. Ghetti et M.D. Benson. 1991. « A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease ». Science, vol. 254, no. 528, octobre, p. 97-99.

NAKAGAWA, T., H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B.A. Yankner et J. Yuan. 2000. « Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . » Nature, vol. 403, janvier, p. 98-103.

NAKAI, M., Z.H. Qin, J.F. Chen, Y. Wang et T.N. Chase. 2000. « Kainic acid-induced apoptosis in rat striatum is associated with nuclear factor-kappaB activation. » Journal of Neurochemistry, vol. 74, no. 2, février, p. 647-658.

NARANG, H.K. 1980. « High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril in Alzheimer's disease. » Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, vol. 39, no. 6, novembre, p.621-631.

NUNOMURA, A., S. Chiba, C.F., Lippa, P. Cras, R.N. Kalaria, A. Takeda, K. Honda, M.A. Smith et G. Perry. 2004. « Neuronal RNA oxidation is a prominent feature of familial Alzheimer's disease. » Neurobiology of Disease, vol. 14, p.108-113.

OSBORN, L., S. Kunkel et G.J. Nabel. 1989. « Tumor necrosis factor α interleukin 1 stimulates the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor κ B. » Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 86, avril, p.2336-2340.

OWEN, R.W., W. Mier, A. Gioacosa, W.E. Hull, B. Spiegelhalder et H. Bartsch. 2000. « Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. » Food and Chemical Toxicology, vol. 38, p. 647-659.

PALMER A.M. et M.A. Burns. 1994. « Selective increase in lipid peroxidation in the inferior temporal cortex in Alzheimer's disease. » Brain Research, vol. 645, no. 1-2, mai, p.338-342.

PANET, H., A. Barzilai, D. Daily, E. Melamed et D. Offen. 2001. « Activation of nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B) is essential for dopamine-induced apoptosis in PC12 cells. » Journal of Neurochemistry, vol. 77, p. 391-398.

PANZA, F., V. Solfrizzi, A.M. Colacicco, A. D'Introno, C. Capurso, F. Torres, A. Del Parigi, S. Capurso et A. Capurso. 2004. « Mediterranean diet and cognitive decline. » Public Health Nutrition, vol. 7, no. 7, octobre, p. 959-963.

PARASURAMAN, R. et A. Martin. 1994. « Cognition in Alzheimer's disease: disorders of attention and semantic knowledge. » Current Opinion in Neurobiology, vol. 4, no. 2, avril, p. 237-244.

PIKE C.J., A.J. Walencewicz, C.G. Glabe et C.W. Cotman. 1991. « In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. » Brain Research, vol. 563, no. 1-2, novembre, p.311-314.

PIKE C.J., D. Burdick, A.J. Walencewicz, C.G. Glabe et C.W. Cotman. 1993. « Neurodegeneration induced by β -amyloid peptides *in vitro*: the role of peptide assembly state. » The Journal of Neuroscience, vol. 13, no. 4, avril, p.1676-1687.

POST, A., F. Holsboer et C. Behl. 1998. « Induction of NF- κ B activity during haloperidol-induced oxidative toxicity in clonal hippocampal cells: suppression of NF- κ B and neuroprotection by antioxidants. » The Journal of Neuroscience, vol. 18, no. 20, octobre, p. 8236-8246.

PRATICO, D., K. Uryu, S. Leight, J.Q. Trojanowski et V.M.-Y. Lee. 2001. « Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. » The Journal of Neuroscience, vol. 21, no. 12, juin, p.4183-4187.

PRATICO, D., V. Zhukareva, Y. Yao, K. Uryu, C.D. Funk, J.A. Lawson, J.Q. Trojanowski et V.M. Lee. 2004. « 12/15-lipoxygenase is increased in Alzheimer's disease: possible involvement in brain oxidative stress. » American Journal of Pathology, vol. 164, no. 5, mai, p.1655-1662.

PUTNAM, K.P., D.W. Bombick, D.J. Doolittle. 2002. « Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. » Toxicology in Vitro, vol. 16, no. 5, octobre, p. 599-607.

QIN, Z.-H., R.W. Chen, Y. Wang, M. Nakai, D.-M. Chuang et T.N. Chase. 1999. « Nuclear factor κ B nuclear translocation upregulates c-Myc and p53 expression during NMDA receptor-mediated apoptosis in rat striatum. » The Journal of Neuroscience, vol. 19, no. 10, mai, p.4023-4033.

RAMASSAMY, C., D. Averill, U. Beffert, S. Bastianetto, L. Theroux, S. Lussier-Cacan, J.S. Cohn, Y. Christen, J. Davignon, R. Quirion et J. Poirier. 1999. «Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype.» Free Radical Biology & Medicine, vol. 27, nos. 5-6, p. 544-553.

RAMASSAMY, C., D. Averill, U. Beffert, L. Theroux, S. Lussier-Cacan, J.S. Cohn, Y. Christen, A. Schoofs, J. Davignon et J. Poirier. 2000. «Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease brain.» Neurobiology of Disease, vol. 7, p. 23-37.

RÉGNIER, C.H., H.Y. Song, X. Gao, D.V. Goeddel, Z. Cao et M. Rothe. 1997. « Identification and characterization of an I κ B kinase. » Cell, vol.90, juillet, p.373-383.

ROHER A.E., D. Wolfe, M. Palutke et D. Kukuruga. 1986. « Purification, ultrastructure, and chemical analysis of Alzheimer disease amyloid plaque core protein ». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 83, avril, p.2662-2666.

ROHER A.E., J.D. Lowenson, S. Clarke, C. Wolkow, R. Wang, R.J. Cotter, I.M. Reardon, H.A. Zürcher-Neely, R.L. Heinrikson, M.J. Ball et B.D. Greenberg. 1993. « Structural alterations in the peptide backbone of β -amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. » The Journal of Biological Chemistry, vol. 268, no. 5, février, p.3072-3083.

ROTHWARF, D.M., E. Zandi, G. Natoli et M. Karin. 1998. « IKK- γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. » Nature, vol.395, p.297-300.

SAILLÉ, C., P. Marin, J.-C. Martinou, A. Nicole, J. London et I. Ceballos-Picot. 1999. « Transgenic murine cortical neurons expressing human Bcl-2 exhibit increased

resistance to amyloid β -peptide neurotoxicity. » Neuroscience, vol. 92, no. 4, p. 1455-1463.

SCHMIDT, K.N., P. Amstad, P. Cerutti et P.A. Baeuerle. 1995. « The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. » Chemical Biology, vol. 2, no. 1, janvier, p. 13-22.

SCHRECK, R., P. Rieber et P.A. Baeuerle. 1991. « Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. » The EMBO Journal, vol. 10, no. 8, p. 2247-2258.

SEN R. et D. Baltimore. 1986. « Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. » Cell, vol. 47, no. 6, décembre, p.921-928.

SHA, W.C., H.C. Liou, E.I. Tuomanen et D. Baltimore. 1995. « Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. » Cell, vol. 80, no. 2, janvier, p.321-330.

SHAKHOV, A.N., M.A. Collart, P. Vassalli, S.A. Nedospasov et V. Jongeneel. 1990. « κ B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor α gene in primary macrophages. » Journal of Experimental Medicine, vol. 171, Janvier, p. 35-47.

SHAN X., H. Tashiro et C.-L. Glenn Lin. 2003. « The identification and characterization of oxidized RNAs in Alzheimer's disease. » The Journal of Neuroscience, vol. 12, no. 12, juin, p.4913-4921.

SHIMIZU, H., K. Mitomo, T. Watanabe, S. Okamoto et K.-I. Yamamoto. 1990. « Involvement of a NF- κ B transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. » Molecular and Cellular Biology, vol. 10, no. 2, février, p. 561-568.

SHIMOHAMA, S., H. Tanimoto et S. Fujimoto. 1999. « Changes in caspase expression in Alzheimer's disease: comparison with development and aging. » Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 256, p.381-384.

SIMMONS L.K., P.C. May, K.J. Tomaselli, R.E. Rydel, K.S. Fuson, E.F. Brigham, S. Wright, I. Lieberburg, G.W. Becker, D.N. Brems, *et al.* 1994. « Secondary

structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. » Molecular Pharmacology, vol. 45, no. 3, mars, p.373-379.

SMALE, G., N.R. Nichols, D.R. Brady, C.E. Finch et W.E. Horton Jr. 1995. « Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease. » Experimental Neurology, vol. 133, p.225-230.

SMITH, J.V., A.J. Burdick, P. Golik, I. Khan, D. Wallace et Y. Luo. 2002. « Anti-apoptotic properties of ginkgo biloba extract EGb 761 in differentiated PC12 cells. » Cellular and Molecular Biology, vol. 48, no. 6, septembre, p. 699-707.

SMITH, J.V. et Y. Luo. 2003. « Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by *Ginkgo biloba* extract EGb 761. » Journal of Alzheimer's Disease, vol. 5, p.287-300.

SMITH, J.V. et Y. Luo. 2004. « Studies on molecular mechanisms of *ginkgo biloba* extract. » Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 64, p.465-472.

SNAPPER, C.M., P. Zelazowski, F.R. Rosas, M.R. Kehry, M. Tian, D. Baltimore et W.C. Sha. 1996. « B cells from p50/NF-kappa B knockout mice have selective defects in proliferation, differentiation, germ-line CH transcription, and Ig class switching. » Journal of Immunology, vol. 156, no. 1, janvier, p.183-191.

SOTO C., E.M. Sigurdsson, L. Morelli, R.A. Kumar, E.M. Castano et B. Frangione. 1998. « Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. » Nature Medicine, vol. 4, no. 7, juillet, p.822-826.

STACKMAN, R.W., F. Eckenstein, B. Frei, D. Kulhanek, J. Nowlin et J.F. Quinn. 2003. « Prevention of age-related spatial memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by chronic *Ginkgo biloba* treatment. » Experimental Neurology, vol. 184, p.510-520.

STADELMANN, C., T.L. Deckwerth, A. Srinivasan, C. Bancher, W. Brück, K. Jellinger et H. Lassmann. 1999. « Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease. » American Journal of Pathology, vol. 155, no. 5, novembre, p.1459-1466.

STEHLIK, C., R. de Martin, I. Kumabashiri, J.A. Schmid, B.R. Binder et J. Lipp. 1998. « Nuclear factor (NF)- κ B-regulated X-chromosome-linked iap gene expression

protects endothelial cells from tumor necrosis factor α -induced apoptosis. » Journal of Experimental Medicine, vol. 188, no.1, juillet, p. 211-216.

SU, J.H., M. Zhao, A.J. Anderson, A. Srinivasan et C.W. Cotman. 2001. « Activated caspase-3 expression in Alzheimer's and aged control brain: correlation with Alzheimer pathology. » Brain Research, vol. 989, p. 350-357.

SUBBARAO K.V., J.S. Richardson et L.C. Ang. 1990. « Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. » Journal of Neurochemistry, vol. 55, no. 1, juillet, p. 342-345.

SUYANG, H., R. Phillips, I. Douglas et S. Ghosh. 1996. « Role of unphosphorylated, newly synthesized I κ B β in persistent activation of NF- κ B. » Molecular and Cellular Biology, vol. 16, no. 10, octobre, p. 5444-5449.

SUZUKI, Y.J., et L. Packer. 1993. « Inhibition of NF- κ B activation by vitamin E derivatives. » Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 193, no. 1, mai, p. 277-283.

TAGLIALATELA, G., R. Robinson et J.R. Perez-Polo. 1997. « Inhibition of nuclear factor kappa B (NF κ B) activity induces nerve growth factor-resistant apoptosis in PC12 cells. » Journal of Neuroscience Research, vol. 47, p.155-162.

TAMAGNO, E., M. Parola, M. Guglielmotto, G. Santoro, P. Bardini, L. Marra, M. Tabaton et O. Danni. 2003. « Multiple signaling events in amyloid β -induced, oxidative stress-dependent neuronal apoptosis. » Free Radical Biology & Medicine, vol. 35, no. 1, p.45-58.

TANZI, R.E., J.F. Gusella, P.C. Watkins, G.A. Bruns, P. St-George-Hyslop, M.L. Van Keuren, D. Patterson, S. Pagan, D.M. Kurnit et R.L. Neve. 1987. « Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. » Science, vol. 235, février, p. 880-884.

THANOS, D. et T. Maniatis. 1995. « Identification of the rel family members required for virus induction of the human beta interferon gene. » Molecular and Cellular Biology, vol. 15, no. 1, janvier, p. 152-164.

TRAENCKNER, E., S. Wilk et P. Baeuerle. 1994. «A proteasome inhibitor prevents activation of NF- κ B and stabilizes a newly phosphorylated form of I κ B- α that is still bound to NF- κ B. » EMBO Journal, vol. 13, p. 5433-5441.

VAN DE STOLPE, A., E. Caldenhoven, B.G. Stade, L. Koenderman, J.A.M. Raaijmakers, J.P. Johnson et P.T. van der Saag. 1994. « 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and tumor necrosis factor α -mediated induction of intracellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone. » The Journal of Biological Chemistry, vol. 269, no. 8, février, p. 6185-6192.

VICKERS J.C., T.C. Dickson, P.A. Adlard, H.L. Saunders, C.E. King et G. McCormack. 2000. « The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease ». Progress in Neurobiology, vol. 60, p.139-165.

VISIOLI, F. et C. Galli. 1994. « Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. » Life Science, vol. 55, no. 24, p. 1965-1971.

VISIOLI, F., G. Bellomo, G.-F. Montedoro et C. Galli. 1995. « Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. » Atherosclerosis, vol. 117, p.25-33.

VISIOLI, F., G. Bellomo et C. Galli. 1998. « Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. » Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 247, p.60-64.

WADSWORTH, T.L. et D.R. Koop. 1999. « Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. » Biochemical Pharmacology, vol. 57, p. 941-949.

WADSWORTH, T.L., T.L. McDonald et D.R. Koop. 2001. « Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced signaling pathways involved in the release of tumor necrosis factor- α . » Biochemical Pharmacology, vol. 62, p. 963-974.

WANG J., D.W. Dickson, J.Q. Trojanowski et M.M.Y. Lee. 1999. « The levels of soluble versus insoluble brain A β distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. » Experimental Neurology, vol. 158, p.328-337.

WARD R.V., K.H. Jennings, R. Jepras, W. Neville, D.E. Owen, J. Hawkins, G. Christie, J.B. Davis, A. George, E.H. Karran et D.R. Howlett. 2000. « Fractionation and characterization of oligomeric, protofibrillar and fibrillar forms of β -amyloid peptide. » Biochemical Journal, vol.348, p.137-144.

WELDON, D.T., S.D. Rogers, J.R. Ghilardi, M.P. Finke, J.P. Cleary, E. O'hare, W.P. Esler, J.E. Maggio et P.W. Mantyh. 1996. « Fibrillar β -amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS *in vivo*. » The Journal of Neuroscience, vol. 18, no. 6, mars, p. 2161-2173.

WEYERMANN, J., D. Lochmann et A. Zimmer. 2005. « A practical note on the use of cytotoxicity assays. » International Journal of Pharmaceutics, vol. 288, no. 2, janvier, p. 369-376.

WOOD, J.N. 1995. « Regulation of NF- κ B activity in rat dorsal root ganglia and PC12 cells by tumour necrosis factor and nerve growth factor. » Neuroscience Letter, vol. 192, p.41-44.

WORONICZ, J.D., X. Gao, Z. Cao, M. Rothe et D.V. Goeddel. 1997. « I κ B kinase- β : NF- κ B activation and complex formation with I κ B kinase- α and NIK. » Science, vol. 278, octobre, p. 866-870.

XU, J., S. Chen, S. Hinan Ahmed, H. Chen, G. Ku, M.P. Goldberg et C.Y. Hsu. 2001. « Amyloid- β peptides are cytotoxic to oligodendrocytes. » The Journal of Neuroscience, vol. 21, no.RC118, p.1-5.

YAMAOKA, S., G. Courtois, C. Bessia, S.T. Whiteside, R. Weil, F. Agou, H.E. Kirk, R.J. Kay et A. Israël. 1998. « Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation. » Cell, vol.93, juin, p.1231-1240.

YANKNER, B.A., L.K. Duffy et D.A. Kirschner. 1990. « Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. » Science, vol. 250, octobre, p. 279-282.

YAO, Z.-X., K. Drieu, L.I. Szveda et V. Papadopoulos. 1999. « Free radicals and lipid peroxidation do not mediate β -amyloid-induced neuronal cell death. » Brain Research, vol. 847, p. 203-210.

YAO, Z.-X., K. Drieu et V. Papadopoulos. 2001. « The *Ginkgo biloba* extract EGb 761 rescues the PC12 neuronal cells from β -amyloid-induced cell death by inhibiting the formation of β -amyloid-derived diffusible neurotoxic ligands. » Brain Research, vol. 889, p. 181-190.

YOU, M., P.-T. Ku, R. Hrdlickova et H.R. Bose, Jr. 1997. « ch-IAP1, a member of the inhibitor-of-apoptosis protein family, is a mediator of the antiapoptotic activity of the v-Rel oncoprotein. » Molecular and Cellular Biology, vol. 17, no. 12, décembre, p. 7328-7341.

YU, Z.F., D. Zhou, A.J. Bruce-Keller, M.S. Kindy et M.P. Mattson. 1999. « Lack of the p50 subunit of nuclear factor- κ B increases the vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic injury. » The Journal of Neuroscience, vol. 19, no. 20, octobre, p. 8856-8865.

ZANDI, E., D.M. Rothwarf, M. Delhase, M. Hayakawa et M. Karin. 1997. « the I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. » Cell, vol. 91, octobre, p. 243-252.

ZANDI, E., Y. Chen et M. Karin. 1998. « Direct phosphorylation of I-kappa-B by IKK-alpha and IKK-beta: discrimination between free and NF-kappa-B-bound substrate. » Science, vol. 281, no. 5381, août, p. 1360-1364.

ZONG, W.-X., L.C. Edelstein, C. Chen, J. Bash et C. Gélinas. 1999. « The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of nF- κ B that blocks TNF α -induced apoptosis. » Genes & Development, vol. 13, p. 382-387.

**Ginkgo biloba extract (EGb 761) in Alzheimer's disease:
is there any evidence?**

Charles Ramassamy*, Fanny Longpré and Yves Christen¹

Institut National de la recherche scientifique, Institut Armand-Frappier, Pointe-Claire, Canada. INAF,
Univ.Laval, Quebec, Canada..

1 : IPSEN-Beaufour Pharma, 24 Rue Erlanger, 75016 Paris, France

*: corresponding author

INRS-IAF, 245 Boul. Hymus, Pointe-Claire, Québec, Canada,

Tel : (514) 630-8839

Fax : (514) 630-8850

Email : charles.ramassamy@iaf.inrs.ca

Number of text pages : 26

Abstract

For centuries, extracts from the leaves of the Ginkgo biloba tree have been used as Chinese herbal medicine to treat a variety of health disorders. The standardized Ginkgo biloba extract EGb 761 was marketed in France and Germany 30 years ago for various vascular and cerebral deficits and is now classified as a food supplement in the United States. EGb 761 is currently the focus of phase-III clinical trials, GEM and GuidAge studies, to evaluate its efficacy on the prevention of Alzheimer's disease (AD) in subjects over 70 years old. This review summarizes recent advancements in our understanding of the potential role of EGb 761 in the prevention of AD. Besides its well-known free radical scavenging properties, the ability of EGb 761 to protect neurons probably also involves other intracellular pathways. We will point out potential targets of EGb 761 in the amyloid cascade such as its anti-amyloidogenic properties or the regulation of gene expression. Moreover we will discuss the complexity of the cellular and molecular mechanisms of EGb 761 and the significance of the synergic effect of different constituents of EGb 761.

Keywords : free radical scavenger, oxidative stress, β -amyloid synthesis, neurotoxicity, cholesterol, apoptosis, regulation of genes expression

Introduction

Aging may be regarded as the major risk factor for all forms of dementia and particularly for Alzheimer's disease (AD) affecting up to 15 million people worldwide. AD is multifactorial with a complex combination of genetic and non genetic components. Early-onset familial form represents only a small fraction of all AD cases ($\leq 5\%$) and typically presents with age of onset younger than 65 years, with an autosomal dominant transmission while non-genetic or sporadic form represents the majority of these cases. To date 3 genes have been reported to cause early-onset familial form. These include the genes coding for the amyloid precursor protein on chromosome 21, presenilin 1 on chromosome 14, and presenilin 2 on chromosome 1 [1-3]. While these AD-causing mutations occur in 3 different genes located on 3 different chromosomes, they all share a common biochemical pathway, i.e., the altered production of the amyloid β peptide ($A\beta$) with an overabundance of the $A\beta_{1-42}$ species, which leads to neuronal death and dementia. On the other hand, late onset form of AD with age of onset older than 65 years, represents the vast majority of all AD cases with one genetic risk factor, the $\epsilon 4$ allele of the apolipoprotein E gene located on chromosome 19q13 [4,5]. The increased risk with the $\epsilon 4$ allele of the apolipoprotein E has been consistently replicated in a large number of studies across many ethnic groups. Unlike the mutations in the known early-onset familial form genes, $\epsilon 4$ allele of the apolipoprotein E is neither necessary nor sufficient to cause AD but instead operates as a genetic risk factor by decreasing the age of onset in a dose-dependent manner.

In the past 25 years, in addition to these genetic components, there has been a steady increase on the proposed causes of AD including cholinergic neuronal loss [6,7], neuroinflammation [8], oxidative stress [9,10], apoptosis [11], excessive activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors [12], cholesterol [13,14] and amyloid deposition. Each of these mechanisms is being targeted for therapy. Some of them have passed Federal Drug Administration approval for AD treatment, such as cholinesterase inhibitors (Donepezil, ENA-713, Galantamine) or an NMDA receptor antagonist [12]. However the practical effectiveness of these drugs is modest [15]. Furthermore, they did not delay

nursing home placement and consequently did not reduce overall care costs of AD (AD2000 study) [15]. Other drugs have been considered for their preventive effect such as estrogens and nonsteroid anti-inflammatory drugs (Naproxen, Rofecoxib), but they induce some important side effects (cardio-vascular, stroke...) with slight benefits [16]. The risk of dementia was even higher with estrogen (WHIMS study) [17]. Several strategies have been investigated to target A β to slow the progression of AD, from secretase modulators to anti-polymerisation agents (see review by [18]). Vaccines strategies to treat AD have received a great deal of attention as active and passive immunotherapy is also effective in animal models. However, during the phase II clinical trial of an active immunisation against A β_{1-42} , 6% of 300 patients developed acute autoimmune meningoencephalitis, causing the trial to be stopped [19-21]. Therefore, immunotherapy against A β needs optimization of the vaccines targeting highly specific epitopes while reducing side effects (see review: [22]). One amyloid-binding drug, which is effective in reducing polymerisation *in vitro* and plaque deposition in animals, tramiprosate (3-amino-1-propanesulfonic acid; Alzhemed), has now reached the phase III clinical trials [18].

On the other hand, there is more and more evidence that oxidative stress is an early and key factor involved in the development and progression of AD. Recently, a number of epidemiological studies indicate that dietary intake of antioxidants from food (fruit, vegetable and wine) could have preventive effect [23,24,25]. Today, only antioxidants are being tested for preventive properties. Two antioxidants have been in clinical studies: α -tocopherol and the extract of Ginkgo biloba EGb 761. A double-blind, placebo-controlled, multicenter study using α -tocopherol was encouraging [26,27]. However the dose of α -tocopherol was high (2000 IU) and might increase risk of death [28]. Another study is currently testing α -tocopherol and will be completed in 2013 with more than 10,000 individuals (PREADVISE study). Another candidate for preventive effect is the potent antioxidant EGb 761. It is widely employed for cerebrovascular and peripheral vascular insufficiency. Several clinical studies have analyzed the efficacy of EGb 761 on preserving cognitive function in AD. A

critical review was published by Oken *et al.* [29], using a meta-analysis of the published literature. Among 50 studies, several studies met the criteria for an adequate clinical trial in AD [30,31,32]. The studies varied in length of treatment and daily dose of EGb 761 (120 mg or 240 mg). Despite the heterogeneity of effects, the administration of the standardized extract EGb 761 appears to have a modest effect on cognitive function in AD. Interestingly, the effect size was comparable with the donepezil trial [33]. More recently, the meta-analysis in the Cochrane review database concludes that there is a promising evidence of improvement in cognition with EGb 761 [34]. This potential is also observed in EPIDOS study with 1465 women over 75 years in France [35]. In the presence of controversial results for its beneficial effect in AD, EGb 761 is currently the focus of two phase III clinical trials, GEM study (Ginkgo Evaluation of Memory Study) in the United States and GuidAge study in France both with more than 3,000 individuals/study older than 70 years old.

There are consisting data that EGb 761 could display a multi-functional activity (table 1 and figure 1) such as beneficial effects on the A β -induced toxicity, the anti-amyloidogenic pathway, the antioxidant properties, a pro-cholinergic, a cholesterol lowering effect and anti-inflammatory activities. The overall aim of this review is to discuss cellular mechanisms that could underlie the potential effectiveness of EGb 761 in AD.

Components of EGb 761

Most of the scientific literature on Ginkgo biloba extracts concerns EGb 761 which is the best known and the unique standardized extract from a well-defined procedure. Nevertheless, other extracts of Ginkgo biloba have also been marketed but they could be different from EGb 761 with regards to their composition, standardization, and biological effects. EGb 761 contains two major fractions, 6% of terpenes and 24% of flavonoids derivatives, with separate properties, giving this extract its polyvalent pharmacological action [36]. The terpene lactones are represented by the ginkgolides A, B, C, J and M and bilobalide. Ginkgolides are platelet-activating factor antagonists [37], able to reduce platelet

activation and aggregation, and therefore having the potential to improve blood circulation. Bilobalide, a sesquiterpene trilactone, can reduce cerebral edema produced by triethyltin or reduce damage from cerebral ischemia [38,39]. Increased in blood circulation allows higher delivery of oxygen and glucose to the brain following an ischemic event. The flavonoid fraction is composed of 3 flavonols: quercetin, kaempferol and isorhamnetin, which are combined with a sugar. Flavonoids are antioxidants that can trap reactive oxygen species (ROS), chelate pro-oxidant transitional metal ions and modify the expression of antioxidants. Extraction and standardization procedures used to prepare EGb 761 eliminate many compounds with undesirable effects. For instance the ginkgolid acids, which can cause contact dermatitis, are reduced to negligible levels. The mechanisms underlying the beneficial effects of EGb 761 in the central nervous system involve different targets related to the synergistic action of its different constituents.

EGb 761 and the cholinergic neurotransmission

One of the major neuropathological characteristics found in patients who have died from AD is a dramatic degeneration of the central cholinergic neurons with projections into cerebral cortex and the hippocampus, areas of the brain particularly associated with memory [6,40]. The extent of this degeneration correlates with the severity of the cognitive alterations observed in AD. Much progress has been made with cholinesterase inhibitors (Donepezil, ENA-713, Galantamine) to relieve the symptoms. Acting as cholinergic enhancers through prolongation of transmitter half-life within the synaptic cleft, cholinesterase inhibitors have been successful in relieving some of the cognitive and non-cognitive symptoms associated with AD in its mild to moderate stages. However, these interventions are not able to halt or slow the disease progression.

EGb 761 was shown to have several effects on the brain cholinergic system on *in vitro* and animal models. It has been shown that the turnover of acetylcholine in the presynaptic cholinergic nerve terminals could be modified by EGb 761. When directly applied *in vitro* to hippocampal synaptosomes

from young Wistar rats, EGb 761 (15-30 $\mu\text{g/ml}$) increased the V_{max} of the high-affinity choline uptake [41]. This effect was also observed *in vivo* after a long-term treatment of EGb 761 (50 mg/kg/day for 30 days) [41]. These biochemical analyses suggested that EGb 761 can enhance the number of choline carriers in the nerve terminals [41]. Moreover, the acetylcholine release in the hippocampus of 4-month-old rats was higher after an acute administration of EGb 761 (100mg/kg). Muscarinic receptors in the hippocampus could also be targets of EGb 761. Interestingly, in 24-month-old rats, these receptors were increased after a chronic treatment of EGb 761 (100mg/kg/day for 28 days) [42]. EGb 761 could also protect some cholinergic neurons after injury. Indeed the loss of choline acetyltransferase-positive neurons in the nucleus basalis after a bilateral frontal cortex contusion was lower in male rats receiving EGb 761 (100mg/kg) for 7 days [43]. Moreover EGb 761 can reverse cholinergic alterations induced by the A β peptide. For instance, in rats infused intracerebroventricularly with A β_{1-40} for 14 days, EGb 761 treatment (100mg/kg) can partially reverse the memory deficit. Infusion of A β led also to a significant reduction in choline acetyltransferase activity in the cortex and hippocampus while in rats infused with A β and treated with EGb 761, the enzyme activity was significantly higher [44]. These effects of EGb 761 on the cholinergic transmission could be involved, at least in part, in the favorable effect of EGb 761 on cognitive function that has been observed in animal models [45,46] and in some clinical studies [29,34].

EGb 761 protects against the A β -induced oxidative damages

It is now firmly established that oxidative stress is one of the major factors involved in the development and progression of AD (see reviews [9,10]). Several *postmortem* studies on brain tissues from AD patients have indeed revealed an increase in lipid peroxidation [47-55], protein oxidation [56], and nucleic acid oxidation whereas the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, glutathione transferase, glutathione reductase, and catalase) decreased [57-59]. In *post-mortem* tissues from AD patients, we have demonstrated that EGb 761 was able to prevent lipid peroxidation induced

by the pro-oxidant system $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ [54]. Among different constituents of EGb 761, we have shown that the flavonoid fraction of EGb 761 has higher ability to prevent oxidative-induced damages than the terpene fraction [60]. This free radical scavenger activity of EGb 761 could be involved in the protection against the A β toxicity as A β itself has been directly implicated in ROS production. Hensley *et al.* [61] have indeed demonstrated in a cell-free aqueous solution, by electron spin resonance, that A β_{25-35} could generate ROS. Accordingly, direct association between A β deposits and free radical production was also observed in transgenic animal models of AD such as Tg2576 mouse [62], or *in vivo* by multiphoton microscopy [63].

In different cell culture models, it has been shown that A β causes oxidative stress by rapid production of hydrogen peroxide (H_2O_2) [64,65]. Moreover, soluble, aggregated A β is suggested to insert into neuronal membranes, and might then induce lipid peroxidation and protein oxidation. All these A β -induced changes can be prevented by several antioxidants in different cell culture models [66-68]. For instance, in rat primary hippocampal cell culture, Bastianetto *et al.* have demonstrated that a co-treatment with EGb 761 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) protects cells against A β_{25-35} toxicity and strongly inhibits ROS accumulation [69,70]. Moreover, EGb 761 was also able to rescue hippocampal cells from the toxicity induced by H_2O_2 (50-150 μM), a compound mediating A β toxicity [70]. This protection was also observed on PC12 cell model [71]. Interestingly, in N2a swe/ $\Delta 9$ transfected cells which exhibit both increased secretion and intracellular accumulation of A β and H_2O_2 , EGb 761 could also attenuate the levels of H_2O_2 [72]. Using genetically modified models expressing AD mutations, Smith and Luo have demonstrated that a pretreatment with EGb 761 significantly lower ROS levels both in cellular model stably expressing an AD-associated double mutation and in *C. elegans* AD model [72]. However, the protective effect of EGb 761 on oxidative markers in mice model of AD remains to be determined.

EGb 761 and the metabolism of APP

A β originates from a larger precursor APP involving the β -secretase cleavage leading to the amyloidogenic pathway. Alternatively, APP can be processed by a physiological route that involves alpha-secretase and results in a large extracellular domain of APP, alphaAPPs, a non-amyloidogenic and non-toxic pathway. Interestingly, on hippocampal slices, Colciaghi et al. have demonstrated that EGb 761 could induce the metabolism of APP toward the alpha-secretase pathway, thus increasing the release of alphaAPPs. This result adds a new pathway in the comprehension of the mechanism of action of EGb 761. It is particularly interesting as the activity of alpha secretase, both in the cerebrospinal fluid and peripheral (platelets) compartments, is decreased in AD [73]. Then capability of EGb 761 to positively influence the alpha-secretase pathway was assessed *in vivo*. Interestingly in rats treated with EGb 761 (150 mg/kg) for 5 days, the alpha-secretase activity was increased in hippocampus and cerebral cortex but this effect was not due to an increase in the synthesis of APP as the amount of APP was not modified [73]. These results were strengthened by those observed in Brown Norway rats receiving a lower dose of EGb 761 (50mg/kg) for 28 weeks. In these rats, the production of A β and APP in blood vessel walls in cerebral cortex was also reduced [74]. The effect of EGb 761 on the A β production was also studied on a transgenic mouse model of AD [75]. These mice express a mutant form of human APP and exhibit an age-related cognitive deficit. When EGb 761 treatment was initiated at 8 months of age (before plaque formation) and continued until 14 months (age with well established amyloid deposition), A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ levels were comparable between control Tg 2576 mice and Tg2576-treated mice with EGb 761 [46]. However Tg-2576 mice treated with EGb 761 have an enhancement of spatial learning and memory comparable to wildtype mice. These results are in line with the findings from Morgan's group demonstrating that vaccination against an amyloidogenic A β preparation protects against cognitive decline in APP-tg mice but the beneficial effect of vaccination do not correlated with removal of amyloid deposits [76]. These observations are in accordance with the

hypothesis that cognitive deficits are due to soluble oligomers A β -derived neurotoxins called ADDLs [77]. Furthermore, these results are supported by the notion that plaques are not prerequisite for pathogenesis and that elimination of plaques is not necessary for therapeutic benefits.

EGb 761 and A β fibrils formation

The dominant hypothesis of the past 10 years in AD has been the “amyloid cascade” where dementia and neuronal death were caused by amyloid fibrils which are found in senile plaques. These fibrils are large insoluble polymers mainly generated from the 42 amino-acid, self-aggregated A β . Indeed this secondary structure determines several important properties of A β that may be relevant to the pathogenesis of AD. Thus, incubation of A β in aqueous solution for several days before use (process of ageing) induced a conformational transition from random coil to β -sheet and has been reported to increase A β fibril formation and thereby its neurotoxicity [78-81]. Furthermore A β peptides with high content of β -sheets become partially resistant to proteolytic degradation, and this may be a crucial mechanism in amyloid deposition [80]. Thus the prevention of amyloid fibril formation seems to be a promising strategy for the treatment of AD. The antifibrillogenic activity of EGb 761 has been tested in different models [71] [82]. For instance, in a cell-free system using the Thioflavine T method, we and others had reported that EGb 761 prevented A β fibrillogenesis [83,84]. The concentration required for 50% inhibition of A β aggregation is between 20 and 100 μ g/ml. The effect of EGb 761 on A β fibrillogenesis was also visualized by electron microscopy [82]. In neuroblastoma cell line stably expressing an AD-associated double mutation, Luo et al. reported that EGb 761 also inhibited the formation of amyloid fibrils in the conditioned medium [82]. Interestingly, Yao et al. have also tested the hypothesis that EGb 761 could inhibit the formation of ADDLs, A β -derived diffusible neurotoxic soluble ligands. They reported that EGb 761 was also able to inhibit in a dose dependent manner the formation of the 22 and the 16kDa ADDLs, presumably dimer and tetramer of A β [71]. Several properties of EGb 761 could underlie this activity such as its metal ion-scavenging ability, as the A β

fibrillogenesis is dependent on the presence of transition metals. The prevention of the oxidation of some amino acid by EGb 761 could also be involved. Furthermore the inhibition of A β fibrillogenesis by EGb 761 in N2aswe/ Δ 9 cell cultures was associated with a decrease of mitochondrion-initiated apoptosis [82].

EGb 761 and apoptosis

Cell death via apoptosis follows the activation of effector proteases, called caspases, which participate in enzymatic cascades that terminate in cellular disassembly. In total, more than 10 different caspases have been identified so far, and each member displays distinct substrates specificity. This action could occur through several routes, including mitochondria-independent and -dependent pathways. A β peptides have been shown to increase the activity of caspase-3 in different models such as in primary cerebellar neurons [85] or in retinoic acid differentiated SK-N-BE neuroblastoma cells [86]. Cells overexpressing mutated forms of presenilin also displayed higher activity of caspase-3, and thereby are often sensitized to apoptotic stimuli [83]. Indeed in neuroblastoma cells N2a swe/ Δ 9 expressing mutated APP and PS1, the mitochondrion-initiated apoptosis was observed only after transgene expression [82]. Interestingly when these cells were treated with EGb 761 (100 μ g/ml) for 48 hours before the induction of transgene expression, the mitochondrion-initiated apoptosis was lower [82]. Changes in the mitochondrial membrane potential lead to the release of cytochrome C into the cytoplasm, caspase activation and apoptosis [87]. EGb 761 was also able to prevent serum deprivation- and staurosporine-induced mitochondrial damage and attenuated release of cytochrome C and DNA fragmentation [88,89]. Other member of the caspase family, such as caspase-12, has been also found to mediate apoptosis resulting from A β cytotoxicity [90]. Since, in PC12 cells differentiated by nerve growth factor, the expression of caspase-12 is down-regulated in the presence of EGb 761 [88]. On the other hand, EGb 761 could increase the expression of Bcl-2 in nerve growth factor differentiated PC12 cells [88]. Bcl-2 is a pro-survival protein family which prevents apoptotic cell death, in AD, its

expression is altered in neurons from hippocampus and frontal neo-cortex [91,92]. These results suggest that inhibition of apoptotic machinery may, at least in part, mediate the neuroprotective effects of EGb 761.

EGb 761 reduces A β production by lowering free cholesterol levels

Over the past 15 years, several epidemiological studies have shown an association between high serum concentrations of cholesterol and an increased susceptibility to AD [93], likely influenced by the apolipoprotein E4 genotype [94]. The mechanism by which cholesterol affects A β production and metabolism is not fully understood. Cholesterol may influence the activity of the enzymes involved in the metabolism of APP and in the production of A β . In animal studies, dietary cholesterol indeed accelerates A β deposition in the brain whereas cholesterol-lowering drugs lower it [95,96]. Yao et al. provide evidence that the decrease of the production of APP and A β in the rat brain by EGb 761 is mediated through the lowering of free cholesterol levels [74]. They observed that after 28 weeks of treatment with EGb 761 (50 mg/kg), circulating free cholesterol levels were lowered by 16%. Interestingly, in PC12 cells, EGb 761 can inhibit the cholesterol-induced overproduction of APP in a concentration dependent manner [71]. Accordingly, it is suggested that EGb 761 could decrease free cholesterol influx into neurons and increased cholesterol efflux. These findings are of great interest considering the hypothesis that increased cellular cholesterol concentrations can induce the synthesis of A β while reducing cholesterol levels in both neurons and peripheral cells can enhance the non-amyloidogenic alpha-secretase pathway and thereby reducing the production of A β .

EGb 76 and regulation of gene expression

Several studies have emphasized the complexity of effects of EGb 761 by showing its influence on the expression of various genes. For instance, in addition to its direct action as a NO-scavenger [97], EGb 761 can decrease the expression of the gene encoding for iNOS [98]. This regulation could be mediated

through the inhibition of the activity of p38MAPK, which is required for iNOS expression [99]. This effect was also observed in the brain when rats were treated with EGb 761 (50 mg/kg/day). This property of EGb 761 is particularly interesting as NO is involved in neuroinflammation. Other genes involved in cellular defense and repair are also regulated by EGb 761. Indeed, when cells are incubated with EGb 761 (100 μ g/ml) for 72h, the levels of mRNAs associated with various transcription factors, antioxidant enzymes (glutathione, heme oxygenase-1, the regulatory/catalytic subunits of γ -glutamyl-cysteinyl synthetase, superoxide dismutase), mitochondrial proteins, proteins involved in intracellular vesicular transport, and in DNA synthesis and repair are upregulated (see review [100].) Regarding antioxidant enzymes, the induction of heme oxygenase-1 by EGb 761 [101] could increase the resistance of neurons against oxidative stress-induced injury. The upregulation of γ -glutamyl-cysteinyl synthetase by EGb 761 is also associated with the increased expression of the gene encoding for glutathione peroxidase [102]. These effects are particularly interesting as the expression of glutathione peroxidase and the glutathione level decrease in cerebral cortex and hippocampus during aging [103] and in AD [54,55]. Moreover, on primary neuronal cultures, EGb 761 could also induce heme-oxygenase-1 [104]. This enzyme acts as an antioxidant enzyme by degrading heme into iron, carbon monoxide, and biliverdin which is rapidly converted into bilirubin. Furthermore, in rodent brain, Watanabe et al., have demonstrated that when mice received EGb 761 (36mg/kg) during for 4 weeks, the levels of mRNA coding for transthyretin were increased in hippocampus and cortex [105]. This protein could play a neuroprotective role and particularly in AD as transthyretin has been reported to scavenge A β and reduce amyloid plaque formation [106,107].

The activation of MAPKs and the redox-sensitive transcription factor NF- κ B and AP-1 represent key events in the signal transduction pathways and gene expression. It has been shown that flavonoids may affect cellular functions by regulating the activity of these transcriptions factors. We can not exclude the possibility that flavonoids constituents of EGb 761 can modulate the activity of these transcription

factors. Taken together, these data revealed that EGb 761, independently to its free radical scavenger property, can modulate the transcription of several genes involved in the regulation of antioxidant. This effect can increase cellular tolerance to oxidative stress and thereby could prevent or protect cells against oxidative insults underlying some neurodegenerative diseases such as AD.

Synergistic actions and interactions of constituents of EGb 761

EGb 761 contains multiple components belonging to different class of compounds such as flavonoids, terpene lactones (ginkgolides, bilobalide) and proanthocyanidins. The question arises as to which of these compounds mediates the neuroprotective activity of EGb 761. For instance, bilobalide, ginkgolide J and the flavonoids fraction have been shown to inhibit A β fibrillation [82,83]. Flavonoids are also involved in the inhibition of the formation of ADDLs [71] and in the protection against A β toxicity in hippocampal primary neurons [70]. We have previously shown that flavonoids could also protect the dopamine uptake system on synaptosomes against the oxidative-induced damages [108]. The neuroprotective effect of EGb 761 also involves ginkgolide B as it could attenuate the upregulation of nitric oxide synthase (cNOS and iNOS) after an injury in rat brain [109]. On the other hand bilobalide could also upregulate two mitochondrial-DNA-encoded genes, subunits III of cytochrome C oxidase and subunit ND1 of NADH deshydrogenase [110]. This mechanism provides a possible explanation for the anti-ischaemic properties of the Ginkgo biloba extract [111]. In cerebral ischemia models, the administration of bilobalide, ginkgolide A or ginkgolide B before ischemia can reduce the infarct area in mouse brain. In primary cultures of hippocampal neurons and astrocytes from neonatal rats, ginkgolide B and bilobalide protected neurons against damage caused by glutamate [39]. Ginkgolide B, ginkgolide J and bilobalide reduced the apoptotic damage. The results suggest that some of the constituents of the non-flavone fraction of EGb 761 display neuroprotective and anti-apoptotic capacity. In contrast, ginkgolic acids induced neuronal death but these constituents were removed from EGb 761 below an amount of 0.0005 %. These observations demonstrate that a synergistic action could

occur between different bioactive compounds present in EGb 761. This interaction could explain the pleiotropic effects of EGb 761 and is particularly useful in neuroprotection.

EGb 761 and other natural products tested for anti-A β and related effects in AD.

Several phenolic compounds or natural products have been tested for their anti-A β effects in animal and *in vitro* models. Curcumin is a bioactive compound present in the Indian spice turmeric (*Curcuma longa*) with antioxidant and anti-inflammatory activities [112-114]. Curcumin has been shown to inhibit A β aggregation (IC₅₀=0.8 μ M), to prevent A β ₁₋₄₂ oligomer formation and toxicity [115,116]. A peripheral injection of curcumin in Tg2576 mice induced the reduction of amyloid levels and plaque burden [113,115]. In this model, EGb 761 did not change A β plaque burden but can prevent an age-dependent decline in spatial cognition [46]. As EGb 761, curcumin can also protect PC12 cells against A β oligomers and fibrils [117]. Curcumin can also attenuate the diet-induced hypercholesterolemia [118] by changing the expression of genes involved in cholesterol homeostasis [119]. It is currently a focus of 2 clinical trials by the John Douglas Foundation Institute for the Study of Aging and the second is conducted in China (by the Chinese University of Hong Kong) combined with EGb 761 with 30 participants/study to evaluate its effectiveness and safety in AD. These studies will be completed at the end of 2006 and on February 2007, respectively. Other natural extracts have also been tested for their anti-amyloid effects such as Huperzine A, an extract of *Huperzia serrata*, a cholinesterase inhibitor. Huperzine A can reverse the A β -induced down regulation of APP secretion and the protein kinase C in rat [120]. In this model, EGb 761 can increase the release of sAPP α in a PKC-independent manner [73]. A phase II study conducted by the NIH with Huperzine A started on April 2004 and will be completed on December 2006 with a total of 150 participants to determine its effectiveness in AD patients. (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), the main polyphenolic constituent of green tea, has been shown to reduce A β generation in murine neuron-like cells (N2a) or Chinese hamster ovary cells

transfected with the human "Swedish" mutant APP and in primary neurons derived from Tg2576 mice [121,122]. EGCG can promote the nonamyloidogenic alpha-secretase proteolytic pathway and protect neurons against A β toxicity [122,123]. Taken together, polyphenol from green and black teas could play an interesting role in the prevention of AD. The root extract of *Dispacus asper*, a chinese herb, has been shown to significantly improve animal's performance impairment in the passive avoidance task [124]. It is also able to suppress the overexpression of hippocampal A β immunoreactivity in impaired cognitive function animals [124]. The ability of ginsenoside Rb1 and M1 (a protopanaxadiol-type saponin), an extract from Panax, to preserve the impairment of learning memory and to recover the levels of phosphorylated NF-H and synaptophysin to control levels in the presence of A β ₂₅₋₃₅ has been observed in wild-type mice [125]. In *in vitro* cell culture model, the ginsenoside M1 can induce an axonal extension of neurons [125]. As EGb 761, these polyphenolic compounds or extracts display multipharmacological neuroprotective activities such as anti-inflammatory, anti-oxidant, pro-cholinergic or anti-amyloid properties. These compounds could be interesting for the multifactorial nature of neurodegenerative diseases such as AD. The results of these clinical trials will be interesting to explore their therapeutic potential as an alternative treatment or as a combined therapy.

Conclusion

Although the leaves of Ginkgo biloba tree were used for centuries as a Chinese herbal medicine to treat a variety of health disorders, its interest and knowlewdge was strengthened in the last three decennies with the availability of a standardized and well characterized extract of Ginkgo biloba EGb 761. EGb 761 is a well-known antioxidant and could prevent the A β -induced oxidative damage. However, its property is not limited to the antioxidant activity (figure 1). In addition to this, it could display a wide variety of action such as to inhibit the A β fibril formation, the toxicity of ADDLs, and modulate the metabolism of APP towards the non-amyloidogenic pathway. The effect of EGb 761 on the A β level could be related to its ability to lower the levels of circulating cholesterol. Furthermore, the inhibition

of the apoptotic machinery may also be a part of the neuroprotective effect of EGb 761. It could also modulate cholinergic transmission in the brain. Clearly, the intracellular mechanisms of action of EGb 761 are complex as it could also regulate the expression of some genes. It is suggested that this regulation could play a key role in the neuroprotective effect of EGb 761 [126]. Some clinical trials have shown the beneficial effect of EGb 761 on cognitive symptoms but it was not confirmed by others. Different clinical trials are currently evaluating the efficacy of EGb 761 on old individuals who are at risk for cognitive decline in memory (GEM and GuidAge studies).

In conclusion, EGb 761 contains multiple compounds that can act synergistically on different intracellular pathways involved in the neuropathology of AD. As some studies show no benefits of EGb 761 in AD and others show that its efficacy is comparable with the second generation of cholinesterase inhibitors, the results from GEM and GuidAge studies will be interesting to explore the therapeutic potential of EGb 761 as an alternative treatment of AD, even at the early stages, and eventually as part of a combined therapy, according to the complementary mechanism(s) of action.

Acknowledgment: this study was supported by grants from CIHR/Health Canada (CR).

Reference List

1. Chartier-Harlin MC and others. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 353(6347) : 844-6 (1991).
2. Levy-Lahad E and others. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269(5226) : 973-7 (1995).
3. Sherrington R and others. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375(6534) : 754-60 (1995).
4. Poirier J and others. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 342(8873) : 697-9 (1993).
5. Strittmatter WJ and others. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(5) : 1977-81 (1993).
6. Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B and Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217(4558) : 408-14 (1982).
7. Perry EK, Gibson PH, Blessed G, Perry RH and Tomlinson BE. Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J Neurol Sci* 34(2) : 247-65 (1977).
8. Klegeris A and McGeer PL. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and other anti-inflammatory agents in the treatment of neurodegenerative disease. *Curr Alzheimer Res* 2(3) : 355-65 (2005).
9. Markesbery WR. The role of oxidative stress in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 56(12) : 1449-52 (1999).
10. Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 71(2) : 621S-629S (2000).
11. Takuma H, Tomiyama T, Kuida K and Mori H. Amyloid beta peptide-induced cerebral neuronal loss is mediated by caspase-3 in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol* 63(3) : 255-61 (2004).
12. Rossom R, Adityanjee and Dysken M. Efficacy and tolerability of memantine in the treatment of dementia. *Am J Geriatr Pharmacother* 2(4) : 303-12 (2004).
13. Shobab LA, Hsiung GY and Feldman HH. Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 4(12) : 841-52 (2005).
14. Sjogren M, Mielke M, Gustafson D, Zandi P and Skoog I. Cholesterol and Alzheimer's disease--is there a relation? *Mech Ageing Dev* 127(2) : 138-47 (2006).
15. Schneider LS. AD2000: donepezil in Alzheimer's disease. *Lancet* 363(9427) : 2100-1 (2004).
16. Aisen PS and others. Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial. *JAMA* 289(21) : 2819-26 (2003). Notes: CORPORATE NAME: Alzheimer's Disease Cooperative Study.

17. Craig MC, Maki PM and Murphy DG. The Women's Health Initiative Memory Study: findings and implications for treatment. *Lancet Neurol* 4(3) : 190-4 (2005).
18. Aisen PS. The development of anti-amyloid therapy for Alzheimer's disease : from secretase modulators to polymerisation inhibitors. *CNS Drugs* 19(12) : 989-96 (2005).
19. Schenk D, Hagen M and Seubert P. Current progress in beta-amyloid immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 16(5) : 599-606 (2004).
20. Orgogozo JM and others. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 61(1) : 46-54 (2003).
21. Nicoll JA and others. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med* 9(4) : 448-52 (2003).
22. McGeer EG and McGeer PL. Abeta immunotherapy and other means to remove amyloid. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4(5) : 569-73 (2005).
23. Commenges D and others. Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur J Epidemiol* 16(4) : 357-63 (2000).
24. Engelhart MJ and others. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA* 287(24) : 3223-9 (2002).
25. Morris MC and others. Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study. *JAMA* 287(24) : 3230-7 (2002).
26. Zandi PP and others. Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study. *Arch Neurol* 61(1) : 82-8 (2004). Notes: CORPORATE NAME: Cache County Study Group.
27. Sano M and others. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med* 336(17) : 1216-22 (1997).
28. Lock M and Loblaw A. Vitamin E might increase risk of death. *Can Fam Physician* 51 : 829-31 (2005).
29. Oken BS, Storzbach DM and Kaye JA. The efficacy of Ginkgo biloba on cognitive function in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 55(11) : 1409-15 (1998).
30. Le Bars PL and others. A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of Ginkgo biloba for dementia. North American EGb Study Group. *JAMA* 278(16) : 1327-32 (1997).
31. Kanowski S, Herrmann WM, Stephan K, Wierich W and Horr R. Proof of efficacy of the ginkgo biloba special extract EGb 761 in outpatients suffering from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi-infarct dementia. *Pharmacopsychiatry* 29(2) : 47-56 (1996).
32. Hofferberth B. [The effect of Ginkgo biloba extract on neurophysiological and psychometric

measurement results in patients with psychotic organic brain syndrome. A double-blind study against placebo]. *Arzneimittelforschung* 39(8) : 918-22 (1989).

33. Rogers SL, Farlow MR, Doody RS, Mohs R and Friedhoff LT. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. *Neurology* 50(1) : 136-45 (1998).
34. Birks J, Grimley EV and Van Dongen M. Ginkgo biloba for cognitive impairment and dementia. *Cochrane Database Syst Rev* (4) : CD003120 (2002).
35. Andrieu S and others. Association of Alzheimer's disease onset with ginkgo biloba and other symptomatic cognitive treatments in a population of women aged 75 years and older from the EPIDOS study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 58(4) : 372-7 (2003). Notes: CORPORATE NAME: EPIDOS study.
36. Drieu K. [Preparation and definition of Ginkgo biloba extract]. *Presse Med* 15(31) : 1455-7 (1986).
37. Braquet P. Proofs of involvement of PAF-acether in various immune disorders using BN 52021 (ginkgolide B): a powerful PAF-acether antagonist isolated from Ginkgo biloba L. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 16 : 179-98 (1986).
38. Defeudis FV. Bilobalide and neuroprotection. *Pharmacol Res* 46(6) : 565-8 (2002).
39. Chandrasekaran K and others. Neuroprotective effects of bilobalide, a component of Ginkgo biloba extract (EGb 761) in global brain ischemia and in excitotoxicity-induced neuronal death. *Pharmacopsychiatry* 36 Suppl 1 : S89-94 (2003).
40. Collerton D. Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 19(1) : 1-28 (1986).
41. Kristofikova Z, Klaschka J, Tejkalova H and Benecsova O. High-affinity choline uptake and muscarinic receptors in rat brain during aging. *Arch Gerontol Geriatr* 15(1) : 87-97 (1992).
42. Taylor JE. [Neuromediator binding to receptors in the rat brain. The effect of chronic administration of Ginkgo biloba extract]. *Presse Med* 15(31) : 1491-3 (1986).
43. Attella MJ, Hoffman SW, Stasio MJ and Stein DG. Ginkgo biloba extract facilitates recovery from penetrating brain injury in adult male rats. *Exp Neurol* 105(1) : 62-71 (1989).
44. Tang F, Nag S, Shiu SY and Pang SF. The effects of melatonin and Ginkgo biloba extract on memory loss and choline acetyltransferase activities in the brain of rats infused intracerebroventricularly with beta-amyloid 1-40. *Life Sci* 71 (22) : 2625-31 (2002).
45. Walesiuk A, Trofimiuk E and Braszko JJ. Ginkgo biloba extract diminishes stress-induced memory deficits in rats. *Pharmacol Rep* 57(2) : 176-87 (2005).
46. Stackman RW and others. Prevention of age-related spatial memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by chronic Ginkgo biloba treatment. *Exp Neurol* 184(1) : 510-20 (2003).

47. Saille C and others. Transgenic murine cortical neurons expressing human Bcl-2 exhibit increased resistance to amyloid beta-peptide neurotoxicity. *Neuroscience* 92(4) : 1455-63 (1999).
48. Subbarao KV, Richardson JS and Ang LC. Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. *J Neurochem* 55(1) : 342-5 (1990).
49. Palmer AM and Burns MA. Selective increase in lipid peroxidation in the inferior temporal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res* 645(1-2) : 338-42 (1994).
50. Lovell MA, Ehmann WD, Mattson MP and Markesbery WR. Elevated 4-hydroxynonenal in ventricular fluid in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 18(5) : 457-61 (1997).
51. Dei R and others. Lipid peroxidation and advanced glycation end products in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 104(2) : 113-22 (2002).
52. Pratico D and others. 12/15-lipoxygenase is increased in Alzheimer's disease: possible involvement in brain oxidative stress. *Am J Pathol* 164(5) : 1655-62 (2004).
53. Pratico D, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ and Lee VM. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci* 21(12) : 4183-7 (2001).
54. Ramassamy C and others. Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype. *Free Radic Biol Med* 27(5-6) : 544-53 (1999).
55. Ramassamy C and others. Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis* 7(1) : 23-37 (2000).
56. Smith MA and others. Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* 382(6587) : 120-1 (1996).
57. Wang J, Xiong S, Xie C, Markesbery WR and Lovell MA. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 93(4) : 953-62 (2005).
58. Honda K and others. Ribosomal RNA in Alzheimer disease is oxidized by bound redox-active iron. *J Biol Chem* 280(22) : 20978-86 (2005).
59. Nunomura A and others. Neuronal RNA oxidation is a prominent feature of familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 17(1) : 108-13 (2004).
60. Ramassamy C, Girbe F, Christen Y and Costentin J. Ginkgo biloba extract EGb 761 or trolox C prevent the ascorbic acid/Fe²⁺ induced decrease in synaptosomal membrane fluidity. *Free Radic Res Commun* 19(5) : 341-50 (1993).
61. Hensley K and others. A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(8) : 3270-4 (1994).
62. Smith MA and others. Amyloid-beta deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress. *J Neurochem* 70(5) : 2212-5 (1998).

63. McLellan ME, Kajdasz ST, Hyman BT and Bacskai BJ. In vivo imaging of reactive oxygen species specifically associated with thioflavine S-positive amyloid plaques by multiphoton microscopy. *J Neurosci* 23(6) : 2212-7 (2003).
64. Behl C, Davis JB, Lesley R and Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77(6) : 817-27 (1994).
65. Harris ME, Hensley K, Butterfield DA, Leedle RA and Carney JM. Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's beta-amyloid peptide (1-40) in cultured hippocampal neurons. *Exp Neurol* 131(2) : 193-202 (1995).
66. Dhitavat S, Ortiz D, Rogers E, Rivera E and Shea TB. Folate, vitamin E, and acetyl-L-carnitine provide synergistic protection against oxidative stress resulting from exposure of human neuroblastoma cells to amyloid-beta. *Brain Res* 1061(2) : 114-7 (2005).
67. Shea TB, Ortiz D, Nicolosi RJ, Kumar R and Watterson AC. Nanosphere-mediated delivery of vitamin E increases its efficacy against oxidative stress resulting from exposure to amyloid beta. *J Alzheimers Dis* 7(4) : 297-301 (2005).
68. Bruce AJ, Malfroy B and Baudry M. beta-Amyloid toxicity in organotypic hippocampal cultures: protection by EUK-8, a synthetic catalytic free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(6) : 2312-6 (1996).
69. Bastianetto S and Quirion R. Natural extracts as possible protective agents of brain aging. *Neurobiol Aging* 23(5) : 891-97 (2002).
70. Bastianetto S and others. The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid. *Eur J Neurosci* 12 (6) : 1882-90 (2000).
71. Yao Z, Drieu K and Papadopoulos V. The Ginkgo biloba extract EGb 761 rescues the PC12 neuronal cells from beta-amyloid-induced cell death by inhibiting the formation of beta-amyloid-derived diffusible neurotoxic ligands. *Brain Res* 889(1-2) : 181-90 (2001).
72. Smith JV and Luo Y. Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by Ginkgo biloba extract EGb 761. *J Alzheimers Dis* 5(4) : 287-300 (2003).
73. Colciaghi F and others. Amyloid precursor protein metabolism is regulated toward alpha-secretase pathway by Ginkgo biloba extracts. *Neurobiol Dis* 16(2) : 454-60 (2004).
74. Yao ZX, Han Z, Drieu K and Papadopoulos V. Ginkgo biloba extract (Egb 761) inhibits beta-amyloid production by lowering free cholesterol levels. *J Nutr Biochem* 15(12) : 749-56 (2004).
75. Kawarabayashi T and others. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21(2) : 372-81 (2001).
76. Morgan D and others. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408(6815) : 982-5 (2000).
77. Lambert MP and others. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11) : 6448-53 (1998).

78. Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG and Cotman CW. In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res* 563(1-2) : 311-4 (1991).
79. Simmons LK and others. Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Mol Pharmacol* 45(3) : 373-9 (1994).
80. Soto C and others. Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med* 4(7) : 822-6 (1998).
81. Lorenzo A and Yankner BA. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(25) : 12243-7 (1994).
82. Luo Y and others. Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(19) : 12197-202 (2002).
83. Ramassamy C, Poirier J. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and apolipoprotein E isoforms on the β -amyloid fibril formation. In : ed. Christen, Y., editors. *Ginkgo biloba extract (EGb 761) and neurodegenerative diseases*. 2001; p.71-91
84. Smith JV and Luo Y. Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. *Appl Microbiol Biotechnol* 64(4) : 465-72 (2004).
85. Marin N and others. Beta-amyloid-induced activation of caspase-3 in primary cultures of rat neurons. *Mech Ageing Dev* 119(1-2) : 63-7 (2000).
86. Tamagno E and others. Multiple signaling events in amyloid beta-induced, oxidative stress-dependent neuronal apoptosis. *Free Radic Biol Med* 35(1) : 45-58 (2003).
87. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R and Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86(1) : 147-57 (1996).
88. Smith JV and others. Anti-apoptotic properties of Ginkgo biloba extract EGb 761 in differentiated PC12 cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 48(6) : 699-707 (2002).
89. Massieu L, Moran J and Christen Y. Effect of Ginkgo biloba (EGb 761) on staurosporine-induced neuronal death and caspase activity in cortical cultured neurons. *Brain Res* 1002(1-2) : 76-85 (2004).
90. Nakagawa T and others. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403(6765) : 98-103 (2000).
91. O'Barr S, Schultz J and Rogers J. Expression of the protooncogene bcl-2 in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging* 17(1) : 131-6 (1996).
92. Tortosa A, Lopez E and Ferrer I. Bcl-2 and Bax protein expression in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 95(4) : 407-12 (1998).
93. Pappolla MA and others. Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology* 61(2) : 199-205 (2003).
94. Jarvik GP and others. Interactions of apolipoprotein E genotype, total cholesterol level, age, and

- sex in prediction of Alzheimer's disease: a case-control study. *Neurology* 45(6) : 1092-6 (1995).
95. Refolo LM and others. A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 8(5) : 890-9 (2001).
 96. Refolo LM and others. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 7(4) : 321-31 (2000).
 97. Marcocci L, Maguire JJ, Droy-Lefaix MT and Packer L. The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochem Biophys Res Commun* 201 (2) : 748-55 (1994).
 98. Kobuchi H, Droy-Lefaix MT, Christen Y and Packer L. Ginkgo biloba extract (EGb 761): inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7. *Biochem Pharmacol* 53(6) : 897-903 (1997).
 99. Wadsworth TL and Koop DR. Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *Chem Biol Interact* 137(1) : 43-58 (2001).
 100. DeFeudis F. Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on gene expression: possible relevance to neurological disorders and age-associated cognitive impairment. *Drug Dev Res* 57 : 214-235 (2002).
 101. Chen JX, Zeng H, Chen X, Su CY and Lai CC. Induction of heme oxygenase-1 by Ginkgo biloba extract but not its terpenoids partially mediated its protective effect against lysophosphatidylcholine-induced damage. *Pharmacol Res* 43(1) : 63-9 (2001).
 102. Gohil K, Moy RK, Farzin S, Maguire JJ and Packer L. mRNA expression profile of a human cancer cell line in response to Ginkgo biloba extract: induction of antioxidant response and the Golgi system. *Free Radic Res* 33(6) : 831-49 (2000).
 103. Liu RM. Down-regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene expression in rat brain tissue during aging. *J Neurosci Res* 68(3) : 344-51 (2002).
 104. Zhuang H, Pin S, Christen Y and Dore S. Induction of heme oxygenase 1 by Ginkgo biloba in neuronal cultures and potential implications in ischemia. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 48(6) : 647-53 (2002).
 105. Watanabe CM and others. The in vivo neuromodulatory effects of the herbal medicine ginkgo biloba. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(12) : 6577-80 (2001).
 106. Schwarzman AL and others. Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(18) : 8368-72 (1994).
 107. Stein TD and others. Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APPSW mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis. *J Neurosci* 24(35) : 7707-17 (2004).
 108. Ramassamy C, Naudin B, Christen Y, Clostre F and Costentin J. Prevention by Ginkgo biloba extract (EGb 761) and trolox C of the decrease in synaptosomal dopamine or serotonin uptake following incubation. *Biochem Pharmacol* 44(12) : 2395-401 (1992).

109. Sharma HS, Drieu K, Alm P and Westman J. Role of nitric oxide in blood-brain barrier permeability, brain edema and cell damage following hyperthermic brain injury. An experimental study using EGB-761 and Ginkgolide B pretreatment in the rat. *Acta Neurochir Suppl* 76 : 81-6 (2000).
110. Chandrasekaran K, Liu L, Hatanpaa, Krieu K, Rapoport S. Stimulation of mitochondrial gene expression by bilobalide, a component of Ginkgo biloba extract (EGb 761). In : eds. Packer, L. & Christen, Y., editors. *Ginkgo biloba extract (EGb 761) Lessons from cell biology*. France: Elsevier; 1998; p.121-128
111. Janssens D, Delaive E, Remacle J and Michiels C. Protection by bilobalide of the ischaemia-induced alterations of the mitochondrial respiratory activity. *Fundam Clin Pharmacol* 14(3) : 193-201 (2000).
112. Motterlini R, Foresti R, Bassi R and Green CJ. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 28(8) : 1303-12 (2000).
113. Lim GP and others. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci* 21(21) : 8370-7 (2001).
114. Oyama Y and others. Protective actions of 5'-n-alkylated curcumins on living cells suffering from oxidative stress. *Eur J Pharmacol* 360(1) : 65-71 (1998).
115. Yang F and others. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem* 280(7) : 5892-901 (2005).
116. Ono K, Hasegawa K, Naiki H and Yamada M. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *J Neurosci Res* 75 (6) : 742-50 (2004).
117. Park SY and Kim DS. Discovery of natural products from *Curcuma longa* that protect cells from beta-amyloid insult: a drug discovery effort against Alzheimer's disease. *J Nat Prod* 65(9) : 1227-31 (2002).
118. Arafa HM. Curcumin attenuates diet-induced hypercholesterolemia in rats . *Med Sci Monit* 11(7) : BR228-234 (2005).
119. Peschel D, Koerting R and Nass N. Curcumin induces changes in expression of genes involved in cholesterol homeostasis. *J Nutr Biochem* (2006).
120. Zhang HY, Yan H and Tang XC. Huperzine A enhances the level of secretory amyloid precursor protein and protein kinase C-alpha in intracerebroventricular beta-amyloid-(1-40) infused rats and human embryonic kidney 293 Swedish mutant cells. *Neurosci Lett* 360(1-2) : 21-4 (2004).
121. Reznichenko L and others. Reduction of iron-regulated amyloid precursor protein and beta-amyloid peptide by (-)-epigallocatechin-3-gallate in cell cultures: implications for iron chelation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 97(2) : 527-36 (2006).
122. Rezai-Zadeh K and others. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates amyloid

precursor protein cleavage and reduces cerebral amyloidosis in Alzheimer transgenic mice. *J Neurosci* 25(38) : 8807-14 (2005).

123. Bastianetto S, Yao ZX, Papadopoulos V and Quirion R. Neuroprotective effects of green and black teas and their catechin gallate esters against beta-amyloid-induced toxicity. *Eur J Neurosci* 23(1) : 55-64 (2006).
124. Zhang ZJ, Qian YH, Hu HT, Yang J and Yang GD. The herbal medicine *Dipsacus asper* wall extract reduces the cognitive deficits and overexpression of beta-amyloid protein induced by aluminum exposure. *Life Sci* 73(19) : 2443-54 (2003).
125. Tohda C, Matsumoto N, Zou K, Meselhy MR and Komatsu K. A β (25-35)-induced memory impairment, axonal atrophy, and synaptic loss are ameliorated by M1, A metabolite of protopanaxadiol-type saponins. *Neuropsychopharmacology* 29(5) : 860-8 (2004).
126. Christen Y. Ginkgo biloba extract and Alzheimer's disease: is the neuroprotection explained merely by the antioxidant action? In : eds. Luo, Y. & Packer, L., editors. *Oxidative stress and age-related neurodegeneration*. USA: Taylor & Francis; 2006; p.43-58

Figure 1

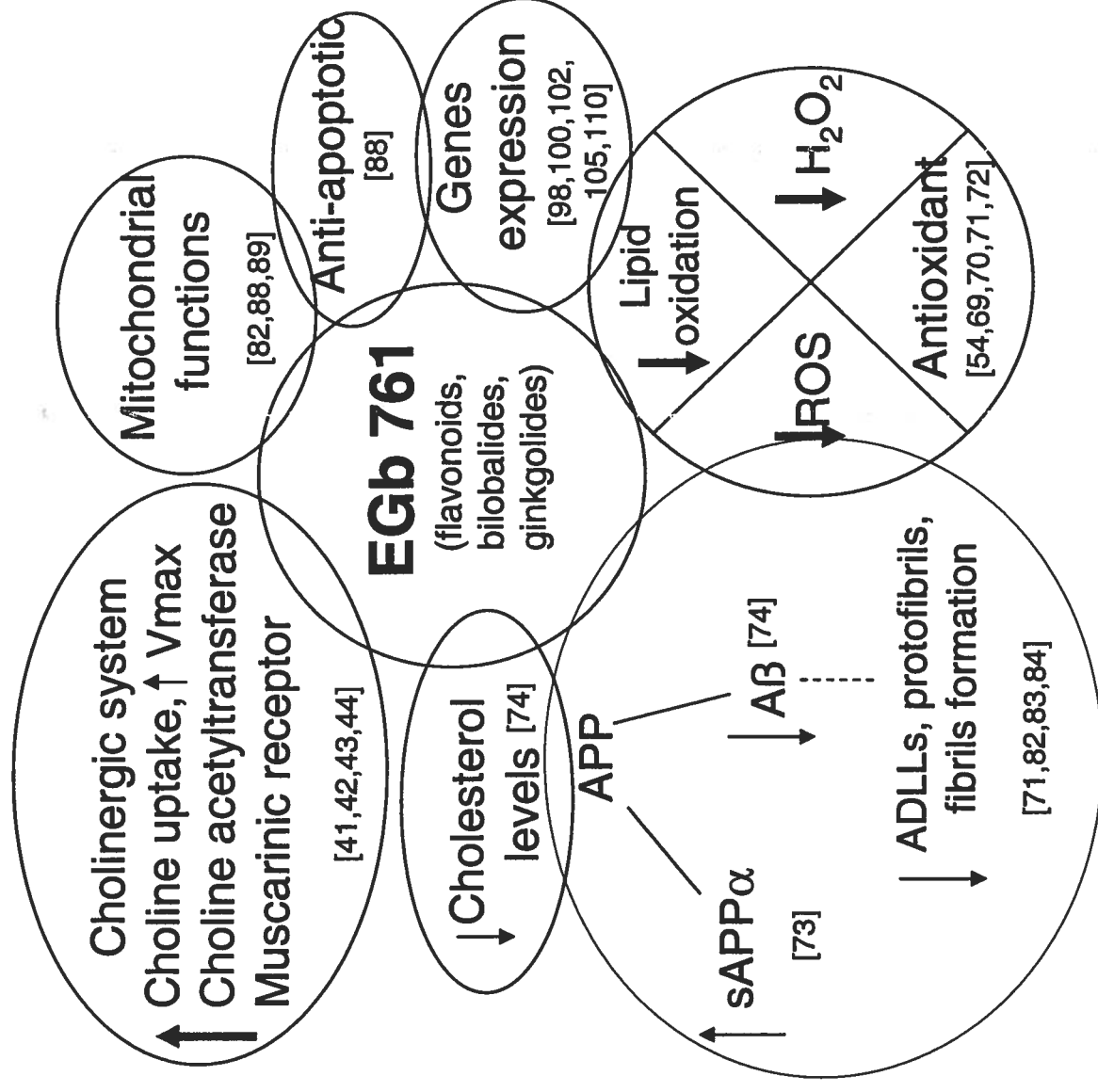


Figure1:**Summary of some mechanisms of EGb 761 potentially involved in neuroprotection**

The standardized extract of Ginkgo biloba EGb 761 contains two major fractions: flavonoids derivatives and terpenes (ginkgolides and bilobalides compounds) [36].

(A) EGb 761 can induce an increase of the V_{max} of the high-affinity choline uptake [41], or the acetylcholine release or the expression of muscarinic receptors [42]. EGb 761 can reverse cholinergic alterations induced by the A β peptide in rats infused intracerebroventricularly with A β ₁₋₄₀ [44] or attenuate the loss of choline acetyltransferase-positive neurons after injury [43].

(B) Flavonoids are antioxidants that can trap reactive oxygen species (ROS), degrade hydrogen peroxide, chelate pro-oxidant transitional metal ions, or prevent lipids from oxidation [54,60,69,70,71,72]. Thus antioxidant activity of EGb 761 could be involved in the protection against the A β toxicity [69,70,71,72] as A β itself is implicated in ROS production and oxidative damages [61,64,65]. (C) EGb 761 could induce the metabolism of APP toward the alpha-secretase pathway, thus increasing the release of sAPP α [73]. Moreover, EGb 761 could prevent A β fibrillogenesis as well as the formation of ADDLs [71,82,83,84]. (D) EGb 761 can inhibit the cholesterol-induced overproduction of APP in a concentration dependent manner. It is also suggested that EGb 761 could decrease free cholesterol influx into neurons and increase cholesterol efflux [71,74]. (E) EGb 761 can decrease the expression of the gene encoding for iNOS [98]. Genes encoding for antioxidant enzymes (glutathione, heme oxygenase-1, the regulatory/catalytic subunits of γ -glutamyl-cysteinyl synthetase, superoxide dismutase) could be upregulated by EGb 761 as well as those encoding for mitochondrial proteins, or for DNA synthesis and repair [100]. (F, G) The mitochondrion-initiated apoptosis was lower in cells treated with EGb 761 [82]. EGb 761 can attenuate the release of cytochrome C, DNA fragmentation [88,89] and the expression of caspase-12 [88]. On the contrary, EGb 761 induced the expression of BCL₂ [88].