



**HAL**  
open science

# Mise en évidence de l'implication d'une mort cellulaire dépendante du fer, la ferroptose, dans des modèles de la maladie de Parkinson

Bruce Do Van

► **To cite this version:**

Bruce Do Van. Mise en évidence de l'implication d'une mort cellulaire dépendante du fer, la ferroptose, dans des modèles de la maladie de Parkinson. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2016. Français. NNT : 2016LIL2S007 . tel-01393917

**HAL Id: tel-01393917**

**<https://theses.hal.science/tel-01393917v1>**

Submitted on 8 Nov 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE Lille – Nord de France**  
**Faculté de Médecine**

Année 2016

N° \_\_\_\_\_

# **THESE**

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE – NORD DE FRANCE

**Discipline : Neurosciences**

Présentée par

Bruce DO VAN

---

**Mise en évidence de l'implication d'une mort  
cellulaire dépendante du fer, la ferroptose,  
dans des modèles de la maladie de Parkinson**

---

Directeur de Thèse : Jean-Christophe DEVEDJIAN

Soutenue le 13 Juillet 2016

## JURY

Pr. David DEVOS

Pr. Erwan BEZARD

Dr. Stéphane HUNOT

Dr. Véronique KEMMEL

Dr. Malika HAMDANE

Dr. Jean-Christophe DEVEDJIAN

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

*A mon père*

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Pharmacologie Médicale, au sein de l'équipe INSERM U1171 sous la direction du Docteur Jean-Christophe Devedjian.

Je tiens à remercier le **Professeur Régis BORDET** de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Merci de votre confiance, de vos conseils précieux et de votre vision toujours juste des choses qui m'ont permis d'évoluer à la fois professionnellement et humainement. Soyez assuré de mon profond respect et de ma reconnaissance.

Je remercie **Monsieur le Professeur Erwan Bezard** d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. C'est pour moi un grand honneur. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mes sincères remerciements.

Je remercie **Monsieur le Docteur Stéphane Hunot** qui a accepté d'accomplir la lourde tâche d'être rapporteur de ma thèse. Soyez assuré de ma gratitude et de mes sincères remerciements.

Je remercie **Madame le Docteur Malika HAMDANE** d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mes sincères remerciements.

Je remercie **Madame le Docteur Véronique KEMMEL** pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse. C'est toi qui m'as lancé dans le grand bain de la recherche en acceptant le jeune étudiant en Master 1 que j'étais pour réaliser un stage dans ton laboratoire. Depuis, nos routes se sont séparées mais en acceptant d'examiner ce travail de thèse, nous pouvons fermer la boucle en espérant t'avoir convaincu du jeune chercheur que je suis devenu. Sois assurée de mon respect et de ma reconnaissance sincère.

Je remercie **Monsieur le Professeur David Devos** d'avoir accepté de présider ce jury. Cette thèse n'existerait pas si tu ne m'avais pas tendu la main à un moment où de nombreuses portes s'étaient fermées devant moi. Tes conseils et critiques, toujours constructives, m'ont été d'une aide précieuse. Merci pour ton hyperactivité et ton dynamisme qui ont toujours été, pour moi, une énorme source de motivation. Sois assuré de ma gratitude et de mes sincères remerciements.

Je remercie **Monsieur le Docteur Jean-Christophe Devedjian**, mon directeur de thèse pour m'avoir accompagné tout au long de mes années passées au laboratoire. Merci pour ton encadrement, ta disponibilité, ton aide et ta confiance pour réaliser cette thèse. J'ai énormément appris à tes côtés et notamment la rigueur scientifique sans faille qui te caractérise et qui m'a permis de progresser durant ces trois années. Sois assuré de ma reconnaissance et de mon plus profond respect.

Je voudrais adresser un immense merci à toute l'équipe. Vous êtes pour moi plus que des collègues de travail. Dès mon premier passage il y a maintenant 4 ans j'ai tout de suite senti une ambiance et une convivialité incroyable. On ne peut espérer de meilleures conditions pour effectuer une thèse. J'ai tellement appris grâce à vous tous je vous en suis infiniment reconnaissant.

Je suis obligé de commencer par le bureau Pharma3 ! Aurélie, Aude, Charlotte et Kelly. Vous avez été au plus proche de moi pendant ces années de thèse et je vous remercie tous pour votre soutien sans faille. Je n'oublierai pas tous les sacrés délires que l'on a pu avoir durant ces années qui seraient trop long à énumérer ici. En tous cas merci.

A Aurélie,

Tu as une place plus qu'importante dans l'élaboration de cette thèse. C'est avec toi que tout a commencé, il y a 4 ans déjà, dans des conditions pas toujours évidentes lorsqu'on squattait la salle de culture du 3<sup>ème</sup>. De nombreuses personnes disent que nous sommes le noyau dur de la culture cellulaire, dans le fond, ils n'ont pas vraiment tort ! Merci pour tout ce que tu as pu m'apprendre quand je suis arrivé. Merci pour tous les bons moments passés à tes cotés, nos énormes délires, nos pauses café maus aussi nos discussions scientifiques et non scientifiques ! Merci pour ton soutien dans mes choix de vie. Plus qu'une collègue tu es devenue une vraie amie.

A Kelly,

Je pense que je ne me suis jamais aussi bien entendu professionnellement avec quelqu'un qu'avec toi. Merci pour ce que tu m'as appris sur les études *in vivo*, même si je dois avouer qu'au final, ce n'est pas trop mon truc. Ton caractère entier et tes coups de gueule vont limite me manquer ! N'oublie pas qu'en septembre 2021, je serai là pour ta soutenance c'est noté dans mon i-agenda!

A Flore,

Au final, même si tu n'es pas dans notre bureau, c'est tout comme. Tu es la dernière arrivée de notre équipe mais par ta gentillesse et surtout ton acharnement au travail tu t'es très vite intégrée. Merci pour tous tes conseils pour la rédaction de ce manuscrit, les innombrables discussions que l'on a pu avoir autour de café-vanille m'ont toutes appris quelque chose et fait avancer.

Merci à toutes les personnes du laboratoire qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'élaboration de cette thèse ou à la rendre agréable en faisant vivre le labo au gré des pots, des repas de Noël (mémorable pour certain !) et tout prétexte pour faire la « fête » : Amélie, Bérangère, Camille, Cédric, Christian, Dominique, Florent, Jackie, Julie, Marion, Maud, Michèle, Nadine, Olivier, Sandrine, sophie, Sylvie, Thavarak, Vincent et Yao.

Un énorme merci à ma maman de m'avoir permis d'en arriver là, de m'avoir soutenu dans mes choix sans forcément tout le temps les comprendre.

Je dédie cette thèse à mon papa. Tu me manques, mais je sais que de là où tu es, tu veilles sur moi comme tu l'as toujours fait.

A mon frère, Brandon, même si les études ce n'est pas ton truc j'espère que tu seras fier de ton grand frère comme je suis fier de toi. Merci pour ton soutien « fratellino ».

Je tiens à remercier profondément ma deuxième famille Bayart.

A mes beaux parents Pascal et Dorothee par tout ce que vous faites pour nous au quotidien, vous avez contribués à rendre ma thèse et la rédaction du manuscrit beaucoup plus simple.

A mon beau-frère, Benjamin, pour les décompressions du week-end, les sorties foot, vélo, rallye et les matchs à Bollaert !

A la team *BeeGee's*, Cédric, Julien et Xav, mes amis d'enfance.

Merci d'être là les mecs quoiqu'il arrive. C'est vrai que nos chemins se sont fortement séparés ces dernières années mais vous êtes là quand il faut, dès que j'en ai besoin et c'est à cela qu'on reconnaît les vrais amis !

A Anais, Anthony (merci pour les modif de schémas!), Elodie, Gautier, Guillaume (Pilou) et Justine pour toutes ces soirées qui m'ont permises de décompresser et de me vider l'esprit. Merci pour votre soutien.

A Elodie, un grand merci pour les corrections de dernières minutes de tout le manuscrit

A ma Compagne, Coralie,

Je te remercie sincèrement pour ta compréhension, ton soutien moral et ton affection. Tu n'as pas toujours tout compris ce que je faisais et je ne t'ai pas rendu la tâche facile par mon caractère et pourtant ton soutien, tes encouragements et parfois tes colères, ta force, ta gentillesse et surtout ton Amour, m'ont apportés ce qui me manquait le plus dans ces moments-là : la patience et la sagesse. Tu m'as offert le plus beau des cadeaux, notre petite fille Shannon, même si elle ne m'a pas rendu la rédaction facile, elle a le pouvoir de me faire oublier instantanément tous mes soucis. Merci Shannon. Je vous aime.

# **SOMMAIRE**

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTES DES TABLEAUX .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>IX</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>X</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>17</b>
<b>I. LA MALADIE DE PARKINSON .....</b>	<b>18</b>
1. GENERALITES.....	18
2. ATTEINTES NEUROPATHOLOGIQUES .....	19
A. <i>Lésions dopaminergiques</i> .....	19
B. <i>Lésions non dopaminergiques</i> .....	19
C. <i>Corps de Lewy</i> .....	20
3. LES MODELES EXPERIMENTAUX DE LA MP .....	21
A. <i>Modèles animaux</i> .....	21
i. Modèles transgéniques.....	21
ii. Modèles neurotoxiques.....	22
iii. Le modèle MPTP .....	24
B. <i>Modèle ex-vivo</i> .....	26
C. <i>Modèles cellulaires</i> .....	26
i. Les cellules souches.....	27
ii. Les cellules primaires .....	27
iii. Les lignées cellulaires tumorales .....	27
iv. Les lignées cellulaires non tumorales .....	28
<b>II. MECANISMES MOLECULAIRES LIES A LA DEGENERESCENCE .....</b>	<b>29</b>
1. COMPLEXE MITOCHONDRIAL .....	29
2. INFLAMMATION ET EXCITOTOXICITE .....	30
3. SYSTEME UBIQUITINE-PROTEASOME .....	31
4. LE STRESS OXYDANT .....	31
A. <i>Sources des ROS</i> .....	32
i. La mitochondrie .....	32
ii. Les peroxysomes.....	32
iii. La NADPH oxydase .....	32
iv. La NO-synthase .....	33
B. <i>Les mécanismes antioxydants</i> .....	33
i. Les superoxydes dismutases.....	33



ii.	La catalase .....	33
iii.	La glutathion peroxydase.....	34
<b>C.</b>	<b>Effets physiologiques des ROS.....</b>	<b>34</b>
<b>D.</b>	<b>Effets toxiques des ROS.....</b>	<b>35</b>
i.	Oxydation des protéines .....	36
ii.	Oxydation de l'ADN .....	36
iii.	Peroxydation lipidique.....	37
<b>E.</b>	<b>Facteurs de susceptibilités des neurones dopaminergiques.....</b>	<b>37</b>
i.	La dopamine.....	37
ii.	La neuromélanine .....	39
iii.	Les lipides.....	40
iv.	Le glutathion .....	40
<b>III.</b>	<b>L'IMPLICATION DU FER DANS LA NEURODEGENERESCENCE .....</b>	<b>41</b>
1.	GENERALITES.....	41
2.	METABOLISME DU FER PERIPHERIQUE .....	41
3.	HOMEOSTASIE DU FER CEREBRAL .....	44
A.	<i>Les différents pools de fer intracellulaire .....</i>	<i>45</i>
B.	<i>Régulation par les éléments de réponse au fer (IRE).....</i>	<i>46</i>
4.	LE ROLE DU FER DANS LA MALADIE DE PARKINSON.....	48
A.	<i>Altération de l'homéostasie du fer dans la maladie de Parkinson.....</i>	<i>48</i>
B.	<i>Le rôle du fer sur les facteurs de susceptibilités des neurones dopaminergiques..</i>	<i>49</i>
5.	LA CHELATION DU FER COMME APPROCHE THERAPEUTIQUE DANS LA MALADIE DE PARKINSON.....	49
<b>IV.</b>	<b>LA MORT NEURONALE DANS LA MALADIE DE PARKINSON.....</b>	<b>52</b>
1.	MORT NEURONALE.....	52
A.	<i>Généralités .....</i>	<i>52</i>
B.	<i>Apoptose.....</i>	<i>52</i>
i.	La voie apoptotique extrinsèque .....	53
ii.	La voie apoptotique intrinsèque .....	53
C.	<i>Autophagie.....</i>	<i>55</i>
D.	<i>Nécrose et nécrose régulée .....</i>	<i>56</i>
i.	Nécrose .....	56
ii.	Nécrose régulée .....	56
E.	<i>Mort neuronale dans la maladie de Parkinson.....</i>	<i>57</i>
<b>V.</b>	<b>LA FERROPTOSE: UNE NOUVELLE FORME DE MORT CELLULAIRE.....</b>	<b>58</b>
1.	DECOUVERTE D'UNE NOUVELLE FORME DE MORT CELLULAIRE .....	58
2.	LA FERROPTOSE, UNE MORT CELLULAIRE POSSEDANT SES PROPRES CARACTERISTIQUES	60
3.	LES CIBLES DE L'ERASTINE .....	61

A. Les voltage-dependent anion channels (VDAC).....	61
B. Le système X <sub>c</sub> <sup>-</sup> .....	61
i. Le système X <sub>c</sub> <sup>-</sup> et l'excitotoxicité du glutamate (Oxytosis).....	62
4. LE REGULATEUR DE LA FERROPTOSE : LA GLUTATHIONE PEROXIDASE 4 (GPX 4).....	63
5. LES INHIBITEURS DE LA FERROPTOSE.....	64
A. Ferrostatine.....	64
B. Liproxstatine-1 .....	64
C. Zileuton .....	65
6. FERROPTOSE ET DEREGLLEMENT CELLULAIRE .....	65
A. Cancers .....	65
B. Les maladies neuronales .....	65
<b>OBJECTIFS DE NOTRE TRAVAIL .....</b>	<b>67</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>70</b>
<b>I. CULTURE CELLULAIRE.....</b>	<b>71</b>
1. ENTRETIEN DES CELLULES .....	71
2. DIFFERENCIATION DES CELLULES.....	71
3. LES TRAITEMENTS .....	72
<b>II. CYTOMETRIE DE FLUX.....</b>	<b>72</b>
1. PREPARATION DES ECHANTILLONS.....	73
2. MESURE DE LA VIABILITE CELLULAIRE.....	74
3. MESURE DES DIFFERENTS STRESS OXYDANTS.....	74
A. Stress oxydant cytosolique.....	74
B. Stress oxydant mitochondrial .....	75
C. Stress oxydant lipidique .....	75
<b>III. ANALYSES BIOMOLECULAIRES.....</b>	<b>75</b>
1. EXTRACTION DES ARN .....	75
2. SYNTHÈSE DES ADN COMPLEMENTAIRES (ADNC).....	76
3. PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL .....	76
4. TRANSFECTION DES SIRNA.....	77
<b>IV. WESTERN BLOT.....</b>	<b>78</b>
1. PREPARATION ET DOSAGE DES ECHANTILLONS .....	78
2. MIGRATION ET SEPARATION.....	78
3. IMMUNODETECTION DES PROTEINES D'INTERET .....	79

<b>V. CULTURES ORGANOTYPIQUES</b> .....	<b>80</b>
1. MISE EN CULTURE.....	80
2. MAINTIEN EN CULTURE.....	80
3. MANIPULATIONS .....	80
A. <i>Visualisation de la mort neuronale</i> .....	80
B. <i>Marquage immuno-TH de la voie nigro-striée</i> .....	81
C. <i>Analyse des images</i> .....	81
<b>VI. ETUDES IN VIVO</b> .....	<b>82</b>
1. ANIMAUX.....	82
2. TRAITEMENTS.....	82
A. <i>Traitement par le MPTP</i> .....	82
B. <i>Prétraitements avec les agents pharmacologiques</i> .....	82
i. <i>La ferrostatine-1</i> .....	83
ii. <i>La liproxstatine-1</i> .....	83
iii. <i>L'inhibiteur de PKC (UCN-01)</i> .....	83
3. TEST DE L'ACTIMETRIE .....	83
4. SACRIFICE DES ANIMAUX.....	84
5. IMMUNOHISTOCHEMIE .....	84
<b>VII. CERVEAUX HUMAINS POST-MORTEM</b> .....	<b>85</b>
1. DESCRIPTION DES PIÈCES ANATOMIQUES .....	85
2. PRÉPARATION DU TISSU HUMAIN .....	86
<b>VIII. ANALYSE STATISTIQUE</b> .....	<b>86</b>
<b>RESULTATS</b> .....	<b>87</b>
<b>I. VALIDATION DU MODÈLE DES LUHMES POUR L'ÉTUDE DES EFFETS DELETÈRES DU FER</b> .....	<b>88</b>
1. EFFET DU FER SUR DIFFÉRENTES LIGNÉES CELLULAIRES .....	88
A. <i>Effet dose-réponse d'une gamme de fer</i> .....	88
B. <i>Effet du fer en condition oxydante</i> .....	88
2. DISCUSSION .....	90
<b>II. ÉTUDE DE L'IMPLICATION DE LA FERROPTOSE SUR LA LIGNÉE NEURONALE DOPAMINERGIQUE (LUHMES)</b> .....	<b>91</b>
1. LA FERROPTOSE DANS LES CELLULES LUHMES.....	91
A. <i>Comparaison de l'effet de l'éraستine par rapport aux cellules cancéreuses</i> .....	91
B. <i>Comparaison de différentes formes de mort cellulaires sur les cellules LUHMES, SHSY-5Y et NSC-34</i> .....	92

C. <i>Effet sur le stress oxydant</i> .....	93
i. Effet de l'érastine sur différents types de stress oxydant .....	93
ii. Effet de l'érastine en condition de stress oxydant induit par la dopamine .....	95
2. MESURE DES CIBLES DE L'ERASTINE SUR LES CELLULES LUHMES ET SUR DES PRELEVEMENTS DE PATIENTS .....	95
A. <i>Mesure des VDAC sur les cellules LUHMES</i> .....	95
B. <i>Mesure des SLC sur les cellules LUHMES</i> .....	96
3. ETUDE DE L'INHIBITION DE LA FERROPTOSE .....	97
4. LE ROLE DU FER DANS LA FERROPTOSE .....	99
A. <i>Effet du chélateur de fer sur la ferroptose</i> .....	99
B. <i>Effet de l'érastine sur les transporteurs du fer</i> .....	99
C. <i>Effet de l'érastine sur la concentration en fer dans les cellules LUHMES</i> .....	100
5. INDUCTION DE LA FERROPTOSE PAR D'AUTRES TOXINES .....	101
A. <i>Induction de la ferroptose sur les cellules LUHMES par différentes neurotoxines</i> .....	101
6. DISCUSSION .....	102
<b>III. IMPLICATION DE LA FERROPTOSE DANS LA MORT DES NEURONES DOPAMINERGIQUES DES PATIENTS PARKINSONIENS</b> .....	<b>103</b>
1. MESURE DES CIBLES DE L'ERASTINE SUR DES PRELEVEMENTS DE PATIENTS .....	103
2. MESURE DE L'EXPRESSION DE GPX4 SUR LES PRELEVEMENTS DE PATIENTS .....	103
3. DISCUSSION .....	106
<b>IV. REGULATION DE LA FERROPTOSE DANS LES NEURONES DOPAMINERGIQUES</b> .....	<b>107</b>
1. EFFETS DES INHIBITEURS DE PROTEINES KINASES SUR LA FERROPTOSE .....	107
2. EFFET DE L'INHIBITION DE LA PKC SUR LA FERROPTOSE .....	110
3. EFFET DE L'INHIBITEUR DE PKC SUR LA FERROPTOSE INDUITES PAR DIFFERENTES TOXINES .....	112
4. EFFET DE L'INHIBITEUR DE PKC SUR LA FERROPTOSE DANS UN MODELE DE CULTURE ORGANOTYPIQUE .....	113
5. DISCUSSION .....	115
<b>V. IMPLICATION DE LA FERROPTOSE DANS UN MODELE ANIMAL DE LA MALADIE DE PARKINSON</b> .....	<b>117</b>
1. TEST DE LA TOXICITE DE LA FERROSTATINE-1 .....	117
2. EFFET DE LA FERROSTATINE-1 SUR LE MODELE MPTP .....	118
A. <i>Schéma du protocole et effectif des groupes</i> .....	118
B. <i>Effet de la ferrostatine-1 sur l'activité locomotrice</i> .....	119
C. <i>Effet de la ferrostatine-1 sur les neurones dopaminergiques</i> .....	120

i. Substance Noire .....	120
ii. Striatum .....	120
3. EFFET DE LA LIPROXSTATINE-1 SUR LE MODELE MPTP .....	123
A. <i>Schéma du protocole et effectif des groupes</i> .....	123
B. <i>Effet de la liproxstatine-1 sur l'activité locomotrice</i> .....	123
C. <i>Effet de la liproxstatine-1 sur les neurones dopaminergiques</i> .....	124
i. Substance Noire .....	124
ii. Striatum .....	124
4. EFFET DE L'INHIBITEUR DE PKC SUR LE MODELE MPTP .....	127
A. <i>Schéma du protocole et effectif des groupes</i> .....	127
B. <i>Effet de l'inhibiteur de PKC (UCN-01) sur l'activité locomotrice</i> .....	128
C. <i>Effet de l'inhibiteur de PKC sur les neurones dopaminergiques</i> .....	128
i. Substance Noire .....	128
ii. Striatum .....	129
5. DISCUSSION .....	131
<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>161</b>
<b>I. VERS UN TRAITEMENT COMBINE .....</b>	<b>162</b>
<b>II. LA FERROPTOSE DANS UN MODELE DE SYNUCLEINOPATHIE.....</b>	<b>164</b>
<b>III. ETUDE DU LIEN ENTRE L'HYPOXIE ET LA FERROPTOSE .....</b>	<b>166</b>
1. MISE AU POINT DES CONDITIONS D'HYPOXIE .....	167
2. EFFET DES INHIBITEURS DE LA FERROPTOSE SUR L'HYPOXIE .....	169
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>171</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>175</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>191</b>

## Liste des figures

- FIGURE 1** : MECANISMES D'ACTION DES NEUROTOXINES UTILISES DANS L'ELABORATION DES MODELES ANIMAUX DE LA MALADIE DE PARKINSON
- FIGURE 2** : METABOLISME ET MECANISME D'ACTION DU MPTP
- FIGURE 3** : CELLULES LUHMES INDIFFERENCIEES
- FIGURE 4** : CELLULES LUHMES DIFFERENCIEES
- FIGURE 5** : LES DIFFERENTS ROS ET LES MECANISMES ANTIOXYDANTS
- FIGURE 6** : METABOLISME TOXIQUE DE LA DOPAMINE
- FIGURE 7** : METABOLISME DU FER PERIPHERIQUE
- FIGURE 8** : REGULATION DE L'ABSORPTION DU FER PAR L'HEPCIDINE
- FIGURE 9** : METABOLISME DU FER CEREBRAL
- FIGURE 10** : REGULATION DU FER INTRACELLULAIRE PAR LES IRE ET LES IRP
- FIGURE 11** : VOIE EXTRINSEQUE ET INTRINSEQUE DE L'APOPTOSE
- FIGURE 12** : PROCESSUS DE FORMATION DES AUTOLYSOSOMES DANS L'AUTOPHAGIE
- FIGURE 13** : MECANISMES D'ACTION DES DIFFERENTES NECROSES REGULEES
- FIGURE 14** : VOIE MOLECULAIRE DE REGULATION DE LA FERROPTOSE
- FIGURE 15** : COMPOSITION DES SYSTEMES XC ET L IMPLIQUES DANS LA FERROPTOSE
- FIGURE 16** : TIME-COURSE DE LA DIFFERENCIATION DES CELLULES LUHMES
- FIGURE 17** : PLANIFICATION DES EXPERIMENTATIONS *IN-VIVO*
- FIGURE 18** : DISPOSITIF DU TEST DE L'ACTIMETRIE
- FIGURE 19** : EFFET DOSE-REPNSE D'UNE GAMME DE FER (FAC) SUR LES CELLULES LUHMES, NSC-34 ET SHSY-5Y
- FIGURE 20** : EFFETS DU MPP+, DE LA DOPAMINE SUR LA VIABILITE ET LE STRESS OXYDANT DES LUHMES
- FIGURE 21** : EFFET DU FER ET DU CHELATEUR, LA DEFERIPRONE (DFP) EN CONDITION "NORMALE" ET EN CONDITION DE STRESS OXYDANT SUR LES CELLULES LUHMES.
- FIGURE 22** : COMPARAISON DES TAUX D'EXPRESSION DES ARNM DE TH ET DE DAT SUR LES CELLULES LUHMES, SHSY-5Y ET NSC-34.
- FIGURE 23** : COMPARAISON DE L'EFFET DE L'ERASTINE SUR LA VIABILITE, MESUREE PAR CYTOMETRIE DE FLUX, DES FIBROBLASTES, DES CELLULES ONCOGENIQUES RAS ET LES CELLULES LUHMES
- FIGURE 24** : COMPARAISON DES EFFETS DE LA FERROPTOSE, DE L'APOPTOSE ET DE L'AUTOPHAGIE SUR LES CELLULES LUHMES, NSC-34 ET SHSY-5Y
- FIGURE 25** : MESURE, PAR CYTOMETRIE DE FLUX, DES STRESS OXYDANTS LIPIDIQUE, CYTOSOLIQUE ET MITOCHONDRIAL INDUIT PAR L'ERASTINE
- FIGURE 26** : DOSAGE DU GLUTATHION TOTAL DANS LES CELLULES LUHMES APRES TRAITEMENT AVEC UNE GAMME D'ERASTINE.
- FIGURE 27** : MESURE DE L'EXPRESSION GENIQUE DE GPX4 DANS LES CELLULES LUHMES SANS ET AVEC TRAITEMENT A L'ERASTINE
- FIGURE 28** : EFFET DE L'ERASTINE EN CONDITION "NORMALE" ET EN CONDITION DE STRESS OXYDANT INDUIT PAR UNE DOSE DE DOPAMINE
- FIGURE 29** : EXPRESSION GENIQUE DES TROIS ISOFORMES DE VDAC DANS LES CELLULES LUHMES SANS ET AVEC TRAITEMENT A L'ERASTINE
- FIGURE 30** : EXPRESSION RELATIVE DES ISOFORMES DE VDAC DANS LES CELLULES LUHMES
- FIGURE 31** : EXPRESSION GENIQUE DES SOUS-UNITES DES SYSTEMES XC- ET L DASN LES CELLULES LUHMES SANS ET AVEC TRAITEMENT A L'ERASTINE
- FIGURE 32** : EFFET DE DIFFERENTS AGENTS PHARMACOLOGIQUES SUR LA VIABILITE DES CELLULES LUHMES
- FIGURE 33** : EFFETS DES INHIBITEURS DE LA FERROPTOSE SUR LE STRESS LIPIDIQUE INDUIT PAR L'ERASTINE
- FIGURE 34** : EFFET DU CHELATEUR DE FER SUR LA FERROPTOSE EN CONDITION "NORMALE" ET EN CONDITION DE STRESS OXYDANT ACCRU PAR UNE DOSE DE DOPAMINE.
- FIGURE 35** : MESURE DE L'EXPRESSION GENIQUE DES TRANSPORTEURS DU FER SANS ET AVEC TRAITEMENT D'UNE DOSE D'ERASTINE
- FIGURE 36** : DOSAGE DU FER FERREUX ET DU FER TOTAL INTRACELLULAIRE SUR LES LUHMES TRAITEES AVEC UNE GAMME D'ERASTINE
- FIGURE 37** : EFFETS DE FER-1 ET DE DFP SUR LA TOXICITE DE DIFFERENTES NEUROTOXINES SUR LES LUHMES

- FIGURE 38** : MESURE DE L'EXPRESSION GENIQUE DES CIBLES DE L'ERASTINE, DE LA TH ET DE GPX4 SUR DES PRELEVEMENTS DE PATIENTS « TEMOINS » ET PARKINSONIENS DANS LE CORTEX PREFRONTAL ET DANS LE CORTEX OCCIPITAL
- FIGURE 39** : MESURE DE L'EXPRESSION GENIQUE DES CIBLES DE L'ERASTINE, DE LA TH ET DE GPX4 SUR DES PRELEVEMENTS DE PATIENTS « TEMOINS » ET PARKINSONIENS DANS LA SUBSTANCE NOIRE ET DANS LE STRIATUM
- FIGURE 40** : SCHEMA DES VOIES DE SIGNALISATION ACTIVEES PAR LES RECEPTEURS A TYROSINE KINASE ET DES INHIBITEURS UTILISES POUR L'ETUDE.
- FIGURE 41** : DOSE REPOSE DES DIFFERENTS INHIBITEURS DE KINASES UTILISES DANS L'ETUDE
- FIGURE 42** : EFFETS DES INHIBITEURS DE KINASES SUR LA VIABILITE ET LE STRESS LIPIDIQUE DES CELLULES LUHMES TRAITEES AVEC L'ERASTINE
- FIGURE 43** : EFFET DE L'INHIBITEUR DE PKC SUR LA VIABILITE ET LE STRESS LIPIDIQUE DES CELLULES LUHMES.
- FIGURE 44** : EFFET DE L'INHIBITION DES ISOFORMES DE PKC SUR LA FERROPTOSE.
- FIGURE 45** : EFFET DES CHELATEURS CALCIQUES SUR LA FERROPTOSE
- FIGURE 46** : DETECTION DE LA FORME PHOSPHORYLEE ET TOTALE DE LA PKC APRES LE PRETRAITEMENT DES CELLULES LUHMES AVEC LES INHIBITEURS DE LA FERROPTOSE
- FIGURE 47** : EFFETS DE L'INHIBITEUR DE PKC, BIS III SUR LA TOXICITE DE DIFFERENTES NEUROTOXINES SUR LA VIABILITE DES CELLULES LUHMES.
- FIGURE 48** : DETECTION DE LA FORME PHOSPHORYLEE ET TOTALE DE LA PKC SUR LES CELLULES LUHMES TRAITEES AVEC DIFFERENTES NEUROTOXINES PUIS AVEC UN PRETRAITEMENT DE FER-1 ET UN PRETRAITEMENT DE DFP
- FIGURE 49** : EFFET DE L'INHIBITEUR DE LA PKC, BIS III, SUR LA FERROPTOSE DANS UN MODELE DE CULTURE ORGANOTYPIQUE DE STRIATUM.
- FIGURE 50** : : COUPES ORGANOTYPIQUES DE LA VOIE NIGRO-STRIEE
- FIGURE 51** : TIME-LINE DU PROTOCOLE EXPERIMENTALE DE L'EXPERIENCE DE TOXICITE DE FER-1
- FIGURE 52** : EFFET DE LA FERROSTATINE-1 SUR L'ACTIVITE LOCOMOTRICE DES SOURIS
- FIGURE 53** : TIME-LINE DU PROTOCOLE DE L'EXPERIENCE PREVENTIVE AVEC FER-1.
- FIGURE 54** : EFFET DE LA FERROSTATINE-1 SUR L'ACTIVITE LOCOMOTRICE SUR LE MODELE MPTP
- FIGURE 55** : EFFET DE LA FERROSTATINE-1 SUR LES NEURONES DOPAMINERGIQUES DE LA SUBSTANCE NOIRE
- FIGURE 56** : EFFET DE LA FERROSTATINE-1 SUR LES FIBRES DOPAMINERGIQUES DU STRIATUM.
- FIGURE 57** : TIME-LINE DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE L'EXPERIENCE PREVENTIVE AVEC LPX-1
- FIGURE 58** : EFFET DE LA LIPROXSTATINE-1 SUR L'ACTIVITE LOCOMOTRICE DES SOURIS MPTP
- FIGURE 59** : EFFET DE LA LIPROXSTATINE-1 SUR LES NEURONES DOPAMINERGIQUES DE LA SN
- FIGURE 60** : EFFET DE LA LIPROXSTATINE-1 SUR LES FIBRES DOPAMINERGIQUES DU STRIATUM
- FIGURE 61** : TIME-LINE DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE L'EXPERIENCE AVEC UCN-01
- FIGURE 62** : EFFET DE L'INHIBITEUR DE PKC SUR L'ACTIVITE LOCOMOTRICE DES SOURIS MPTP
- FIGURE 63** : EFFET DE UCN-01 SUR LES NEURONES DOPAMINERGIQUES DE LA SUBSTANCE NOIRE
- FIGURE 64** : EFFET DE UCN-01 SUR LES FIBRES DOPAMINERGIQUES DU STRIATUM
- FIGURE 65** : EFFET DES INHIBITEURS DE LA FERROPTOSE SUR LA PEROXIDATION LIPIDIQUE DES CELLULES LUHMES TRAITEES AVEC UNE DOSE D'ERASTINE
- FIGURE 66** DOSAGE DU GLUTATHION TOTAL DANS LES CELLULES LUHMES APRES TRAITEMENT AVEC UNE GAMME D'ERASTINE
- FIGURE 67** : DOSAGE DU FER FERREUX ET DU FER TOTAL DANS LES CELLULES LUHMES PRETRAITEES AVEC DES INHIBITEURS DE LA FERROPTOSE
- FIGURE 68** : DETECTION DE L'ALPHA-SYNUCLEINE DANS LES CELLULES LUHMES TRAITEES AVEC UNE GAMME D'ERASTINE
- FIGURE 69** : EFFET D'UNE CINETIQUE D'HYPOXIE SUR LA VIABILITE, LE STRESS OXYDANT CYTOSOLIQUE ET LA PEROXYDATION LIPIDIQUE DES CELLULES LUHMES
- FIGURE 70** : EFFET DES INHIBITEURS DE LA FERROPTOSE, DE L'AUTOPHAGIE ET DE L'APOPTOSE SUR LA VIABILITE, LE STRESS CYTOSOLIQUE ET LE STRESS LIPIDIQUE DES CELLULES LUHMES MISE EN HYPOXIE

## Listes des tableaux

**TABLEAU I** : SONDES CYTOMETRIQUES UTILISEES

**TABLEAU II** : LISTE DES ANTICORPS UTILISES

**TABLEAU III** : CARACTERISTIQUES DES PATIENTS ANALYSES

**TABLEAU IV** : REPARTITION DES EFFECTIFS DE L'EXPERIENCE DE TOXICITE DE FER-1

**TABLEAU V** : REPARTITION DES EFFECTIFS DE L'EXPERIENCE PREVENTIVE DE FER-1

**TABLEAU VI** : REPARTITION DES EFFECTIFS POUR L'EXPERIMENTATION AVEC LA LIPROXSTATINE-1

**TABLEAU VII** : REPARTITION DES EFFECTIFS POUR L'EXPERIMENTATION AVEC LA FERROSTATINE-1

## Liste des abréviations

<b>6-OHDA</b>	6-hydroxydopamine	<b>MP</b>	Maladie de Parkinson
<b>Akt</b>	Antiapoptotic Protein Kinase	<b>MPP+</b>	Ion 1-méthyl-4-phénylpyridinium
<b>ARNm</b>	ARN messenger	<b>MPTP</b>	1-méthyl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
<b>BHE</b>	Barrière hémato-encéphalique	<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin
<b>BSO</b>	Buthionine sulfoxamine	<b>NAC</b>	N-acétylcystéine
<b>COMT</b>	Catéchol-O-méthyl-transférase	<b>NEM</b>	N-éthylmaléimide
<b>CQ</b>	Chloroquine	<b>PFA</b>	Paraformaldéhyde
<b>DA</b>	Dopamine	<b>PHD</b>	Prolylhydroxylases
<b>DAT</b>	Transporteur de la dopamine	<b>PI3k</b>	Phosphatidylinositol-3-kinase
<b>DFP</b>	Défériprone	<b>PKC</b>	Protéine Kinase C
<b>DMT1</b>	Divalent Metal Transporter 1	<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>DPM</b>	Délai <i>post-mortem</i>	<b>PVDF</b>	Polyvinylidène difluoride
<b>Fer-1</b>	Ferrostatine-1	<b>qPCR</b>	Quantitative polymerase chain reaction
<b>GPx</b>	Glutathion Peroxydase 4	<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species ou Espèces réactives de l'oxygène
<b>GSH</b>	Glutathion réduit	<b>SH-SY5Y</b>	Cellules de neuroblastome humain
<b>GSSG</b>	Glutathion oxydé	<b>siRNA</b>	Small Interfering RNA
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène	<b>SN</b>	Substance Noire
<b>HIF-1</b>	Hypoxia Inducible Factor 1	<b>TH</b>	Tyrosine Hydroxylase
<b>IP</b>	Iodure de propidium	<b>VDAC</b>	Voltage-dependent anion channels
<b>LPX-1</b>	Liproxstatin-1	<b>XC-</b>	Transporteur cystéine/glutamate
<b>LUHMES</b>	LUnd Human MESencephalic cells	<b>Zvad</b>	N-benzyloxycarboxyvaline
<b>MAO</b>	Monoamine Oxidase		
<b>MEK</b>	Mitogen-activated protein kinase		



## Résumé

Dans de nombreuses maladies neurodégénératives dont la Maladie de Parkinson mais également dans le processus de vieillissement normal, il a été observé une accumulation excessive des niveaux de fer associée à une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Il est bien connu que le fer (i) participe à la réaction de Fenton pour produire le ROS le plus toxique (le radical hydroxyle), (ii) accélère l'auto-oxydation de la dopamine, augmentant le stress oxydant et (iii) augmente la peroxydation lipidique qui va déclencher l'agrégation des protéines dont l' $\alpha$ -synucléine est une caractéristique de la maladie de Parkinson. Tous ces phénomènes rendent les neurones dopaminergiques très sensible au stress oxydant.

Récemment une nouvelle forme de mort cellulaire a été découverte sur des cellules cancéreuses. Cette mort cellulaire est appelée « ferroptose » car elle dépend essentiellement du fer intracellulaire mais elle est également liée à une très grande augmentation du stress oxydant lipidique.

Dans la première partie, nous avons montré que la lignée de neurones dopaminergiques (LUHMES) est un modèle particulièrement adapté à l'étude de mort cellulaire induite par le fer comparativement à d'autres modèles plus classique.

La seconde partie du travail a été consacrée à l'étude de l'implication de la ferroptose dans les neurones dopaminergiques. Par une approche cellulaire avec les cellules LUHMES, nous avons pu observer (i) que l'inducteur spécifique de cette mort, l'éristine, est très efficace pour induire la mort des cellules dopaminergiques et (ii) que l'inhibition de la ferroptose protégeait de la mort induite par des agents oxydants classiquement utilisés dans les études sur la maladie de Parkinson comme le MPP+. Pour améliorer la compréhension des mécanismes spécifiques de la ferroptose dans les neurones, nous avons étudié de nombreuses voies de signalisation et montré (iii) que la PKC joue un rôle majeur dans la mort par ferroptose.

Tous ces résultats ont ensuite été confirmés dans un modèle de culture organotypique et nous avons dès lors montré que l'utilisation des inhibiteurs de la ferroptose ainsi que celui de la PKC, confère une protection des neurones dopaminergiques dans un modèle de souris MPTP, modèle d'étude de la maladie de Parkinson.

En conclusion ce travail de thèse montre pour la première fois l'implication de la ferroptose dans la maladie de Parkinson et suggère que le développement d'inhibiteurs spécifiques de cette mort cellulaire pourrait être de futures cibles thérapeutiques possibles.

# **INTRODUCTION**

# I. La maladie de Parkinson

## 1. Généralités

La maladie de Parkinson (MP) est une affection neurodégénérative chronique décrite pour la première fois par le docteur James Parkinson en 1817. Elle est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer et la deuxième cause de handicap moteur d'origine neurologique, chez le sujet âgé, après les accidents vasculaires cérébraux (HAS, 2007). Elle touche près de 6,3 millions de personnes dans le monde dont 200 000 en France. Sa prévalence dans les pays occidentaux augmente avec l'âge et atteint, au sein de la population française, 1 à 2% des sujets âgés de plus de 65 ans contre 3 à 4% de la population de plus de 75 ans. 25 000 nouveaux cas par an sont diagnostiqués en France. Sa fréquence est 1,5 fois plus élevée chez les hommes que chez les femmes et survient à l'âge moyen de 58 ans.

Les causes exactes de la maladie de Parkinson sont incertaines mais l'âge reste le principal facteur de risques. Dans 95% des cas, la maladie de Parkinson se déclenche de manière sporadique avec des prédispositions génétiques associées à des facteurs environnementaux parmi lesquels l'exposition aux pesticides et insecticides de type organochlorés est bien établie. Par ailleurs, contrairement à ces formes dites sporadiques, des formes génétiques de maladie de Parkinson ont été mises en évidence (Biskup et al., 2008). Les gènes mis en cause sont regroupés sous le terme PARK (PARK 1 à 15). Certains de ces gènes codent pour une maladie autosomique dominante (PARK1, gènes de l'alpha-synucléine (SNCA) ou PARK 5, l'ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCHL1) ou PARK8, *leucine-rich repeat kinase 2* (LRRK2) alors que d'autres sont responsables de formes autosomiques récessives (PARK2, gène de la parkine ou PARK6, *PTEN-induced novel kinase 1* (PINK1) ou PARK7, l'oncogène DJ-1). De plus, il existe un gène, non désigné par un locus PARK, qui confère clairement un risque de maladie de Parkinson, le gène codant pour la glucérobrosidase (GBA).

Sur le plan clinique, la maladie de Parkinson se caractérise par des syndromes moteurs dont les plus visibles sont le tremblement de repos, une bradykinésie (difficulté à l'initiation des mouvements et ralentissement des mouvements), une rigidité et un affaissement de la posture. La MP s'accompagne également de syndromes non-moteurs comme l'anxiété ou la dépression. Les fonctions cognitives sont longtemps épargnées, mais avec l'évolution de la maladie, il existe, malgré tout, une altération de ces fonctions. (Jankovic, 2008).

## **2. Atteintes neuropathologique**

### **A. Lésions dopaminergiques**

Il est maintenant bien établi que les troubles moteurs visibles dans la MP sont causés par la neurodégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire (SN). Cette neurodégénérescence associée à la présence de corps de Lewy constituent les deux critères anatomo-pathologiques fondamentaux pour diagnostiquer la maladie de Parkinson. En 1925, Foix et Nicolesco décrivent, pour la première fois, la perte des neurones à neuromélanine dans les cerveaux post mortem des patients parkinsoniens (Nicolesco, 1925). Ces travaux seront complétés quelques années plus tard par Hassler qui montre que la dégénérescence dopaminergique n'est pas uniforme au sein de la SNpc et prédomine dans la partie ventrale (Hassler, 1938). De plus, il a été montré que les neurones dopaminergiques contenant de la neuromélanine étaient plus sensibles à la dégénérescence (Hirsch et al., 1988). Les patients restent asymptomatiques jusqu'à ce que 50 à 70% des neurones à dopamine soient détruits et que le cerveau ne soit plus en mesure de compenser la perte dopaminergique.

La perte des neurones dopaminergiques est une des caractéristiques majeures de la MP et est à l'origine du dysfonctionnement des circuits neuronaux impliqués dans le contrôle des fonctions motrices. De fait, le traitement symptomatique le plus couramment utilisé repose sur l'administration de lévodopa, un précurseur de la dopamine. Cependant, au fur et à mesure, son efficacité fluctue au cours de la journée et va engendrer des effets secondaires particulièrement handicapants tels que les dyskinésies. Enfin ce précurseur de la dopamine ainsi que les autres formes de traitement de la MP ne permet pas de ralentir le processus dégénératif. Il est donc aujourd'hui essentiel de mieux comprendre les mécanismes conduisant à la mort de ces neurones pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces.

### **B. Lésions non dopaminergiques**

En plus de ces symptômes moteurs dus à la perte dopaminergiques, les patients parkinsoniens présentent également une large gamme de symptômes non moteurs. En effet, une perte des neurones noradrénergiques, cholinergiques, sérotoninergiques a été décrite dans le cerveau des patients atteints de la MP (Jellinger, 1999).

La perte des neurones contenant la norépinephrine dans le locus coeruleus participerait à l'apparition de la démence dans les phases tardives de la maladie (Dickson et al., 2009).

La perte des neurones sérotoninergiques dans le noyau du Raphé pourrait intervenir, quant à elle, dans les comportements dépressifs associés à la MP.

Enfin, une dégénérescence cholinergique du noyau pédonculo-pontin a été associée aux troubles de la marche et de l'équilibre qui se manifestent chez la plupart des patients parkinsoniens à des stades tardifs d'évolution de la maladie (Karachi et al., 2010).

### C. Corps de Lewy

Les corps de Lewy sont des inclusions intra neuronales mise en évidence par Friederich Lewy il y a plus d'un siècle. Leurs présences récurrentes dans les formes idiopathiques de la MP en on fait le deuxième marqueur histopathologique de la maladie de Parkinson et un critère supplémentaire de diagnostic pathologique (Gibb and Lees, 1989). Les corps de Lewy se présentent classiquement sous la forme d'inclusions circulaires intraneuronales cytoplasmiques de 5 à 25 microns de diamètre. Le marquage histologique révèle la présence d'un coeur éosinophile entouré d'un halo clair (Forno et al., 1996). Bien que sa composition ne soit pas bien définie, il a été établi que l' $\alpha$ -synucléine en est le composant principal, mais on y retrouve également des protéines telles que l'ubiquitine ou la parkin par exemple.

L' $\alpha$ -synucléine a également été observée dans les prolongements, sous forme d'agrégats, formant les prolongements de Lewy. De manière intéressante l'apparition des symptômes semble suivre l'évolution de l' $\alpha$ -synucléine. Sur la base de ces données neuropathologiques Braak *et al.* ont proposé une hypothèse selon laquelle un agent infectieux pourrait être à l'origine de cette synucléinopathie progressive et de nombreuses études tentent de répondre à cette hypothèse (pour revue Brandel et al., 2015).

Bien que les corps de Lewy soient reconnus comme un marqueur histopathologique de la maladie, leurs rôles dans la promotion de la neurotoxicité ou la neuroprotection restent incertains.

Avant la découverte de l' $\alpha$ -synucléine comme étant leur constituant principal, les corps de Lewy étaient associés à la neurodégénérescence (Wakabayashi et al., 2006). Mais cette découverte, ainsi que le fait qu'il existe plusieurs formes d' $\alpha$ -synucléine a changé la donne. Ainsi, les corps de Lewy pourraient assurer un rôle protecteur vis-à-vis de la cellule contre l'accumulation toxique des formes insolubles d' $\alpha$ -synucléine et d'autres protéines (Odagiri et al., 2012). Cette hypothèse est soutenue par la présence au sein des corps de Lewy de protéines impliquées dans les mécanismes de dégradation telle que l'ubiquitine ou la parkin (Pandey et al., 2007).

### 3. Les modèles expérimentaux de la MP

Ce chapitre donne un aperçu des modèles expérimentaux utilisés dans les études sur la maladie de Parkinson, des modèles cellulaires aux modèles animaux. Les modèles utilisés dans cette thèse seront également introduits.

#### A. Modèles animaux

Au cours des dernières décennies, de nombreux modèles animaux ont été élaborés. En règle générale, ils peuvent être divisés en deux types : ceux utilisant des neurotoxines environnementales ou synthétiques, plus anciens, mieux caractérisés et basés sur l'utilisation de neurotoxines capables d'induire une dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques de la SNpc et les modèles transgéniques qui ont émergés de la découverte des formes familiales de la MP.

##### *i. Modèles transgéniques*

Les modèles transgéniques visent à reproduire les mécanismes neurodégénératifs observés dans les formes génétiques de la maladie. Les principaux modèles utilisés reposent sur la manipulation des gènes de l' $\alpha$ -synucléine et de la parkine.

La surexpression de l' $\alpha$ -synucléine humaine mutée induit chez la souris l'apparition d'inclusions intracytoplasmiques contenant de l' $\alpha$ -synucléine et de l'ubiquitine et pouvant ressembler à des corps de Lewy dans le cortex, l'hippocampe et la SN (Masliah et al., 2000). Ces inclusions ne sont pas accompagnées d'une perte neuronale dopaminergique, toutefois des déficits moteurs ont pu être mesurés chez ces souris (Giasson et al., 2002).

Tout comme les souris transgéniques pour l' $\alpha$ -synucléine, les souris KO pour la parkine, ne montrent pas de pertes dopaminergiques significatives (Perez and Palmiter, 2005) mais certaines souris présentent de subtiles anomalies dans la neurotransmission dopaminergique ou noradrénergiques (Von Coelln et al., 2004). En revanche, il est intéressant de noter que la surexpression de la parkine humaine mutée chez la souris conduit à une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques, soutenant l'idée que certaines mutations de la parkine pourraient agir de manière dominante négative (Lu et al., 2009).

La plupart des modèles génétiques présentent un inconvénient majeur puisque la perte neuronale dopaminergique est très faible, ils sont donc utilisés pour étudier les phénomènes intervenant durant la phase pré-symptomatique de la maladie mais ne peuvent être utilisés pour tester des stratégies thérapeutiques, notamment neuroprotectrice.

*ii. Modèles neurotoxiques*

Parmi ces modèles neurotoxiques, on peut distinguer des toxines à effet réversible (réserpine) et irréversible (MPTP, 6-OHDA, le paraquat, roténone). Les études les plus récentes utilisent les toxines irréversibles, et notamment la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) et le 1-méthyl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) pour reproduire la physiopathologie et la symptomatologie liée à la MP.

Le modèle d'intoxication à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) fut le premier modèle animal décrit et utilisé pour modéliser la maladie de Parkinson. Ce composé ne passe pas la barrière hémato-encéphalique et doit donc être injecté directement dans le cerveau. En 1968, Ungerstedt montre que l'injection de 6-OHDA dans la SNpc de rats entraîne un dégénérescence du système dopaminergique nigrostrié. Aujourd'hui, ce modèle est utilisé chez le rat, la souris et le primate non-humain.

Par sa grande analogie structurale avec les catécholamines, la 6-OHDA représente un substrat pour les transporteurs des catécholamines : dopamine, noradrénaline. Une fois dans la cellule, la 6-OHDA s'accumule dans le cytosol et s'auto-oxyde rapidement, conduisant à une augmentation du stress oxydant par production accrue du radical hydroxyle (Heikkila and Cohen, 1972).

Plus récemment, des pesticides, herbicides et fongicides tels que la roténone, le paraquat ou le maneb ont également été appliqués au développement de nouveaux modèles animaux. Par des mécanismes d'actions différents, ces toxines reproduisent la lésion histologique principale de la MP mais également les deux phénomènes maintenant bien décrits dans la MP humaine que sont l'inhibition du complexe I mitochondrial et le stress oxydant (**Figure 1**).

Parmi toutes ces toxines, seul le MPTP est clairement associé à une forme de parkinsonisme humaine et s'est, de ce fait, imposé comme le modèle le plus pertinent.

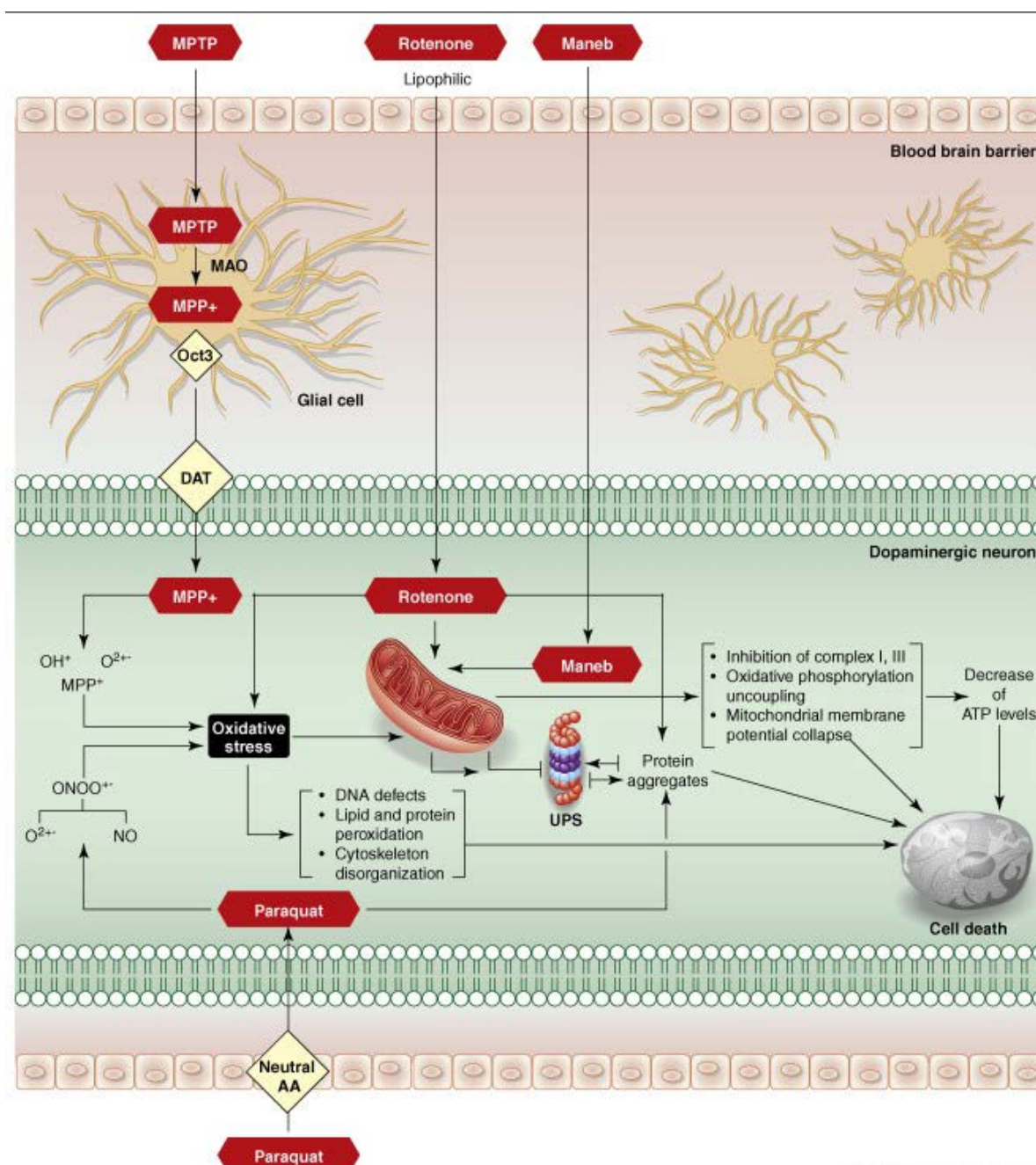


Figure 1 : Mécanismes d'action des neurotoxines utilisés dans l'élaboration des modèles animaux de la maladie de Parkinson (d'après Cicchetti et al, 2009).

Abréviations: AA: Acide aminé; ATP: Adénosine triphosphate; DAT: transporteur de la dopamine; O<sub>2</sub><sup>·-</sup>: anion superoxyde; OH·: radical hydroxyle; ONOO·-; nitroperoxyde MAO: monoamine oxydase; MPP<sup>+</sup>: 1-méthyl-4-phenylpyridinium; MPTP: 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; UPS: Système ubiquitine protéasome.



*iii. Le modèle MPTP*

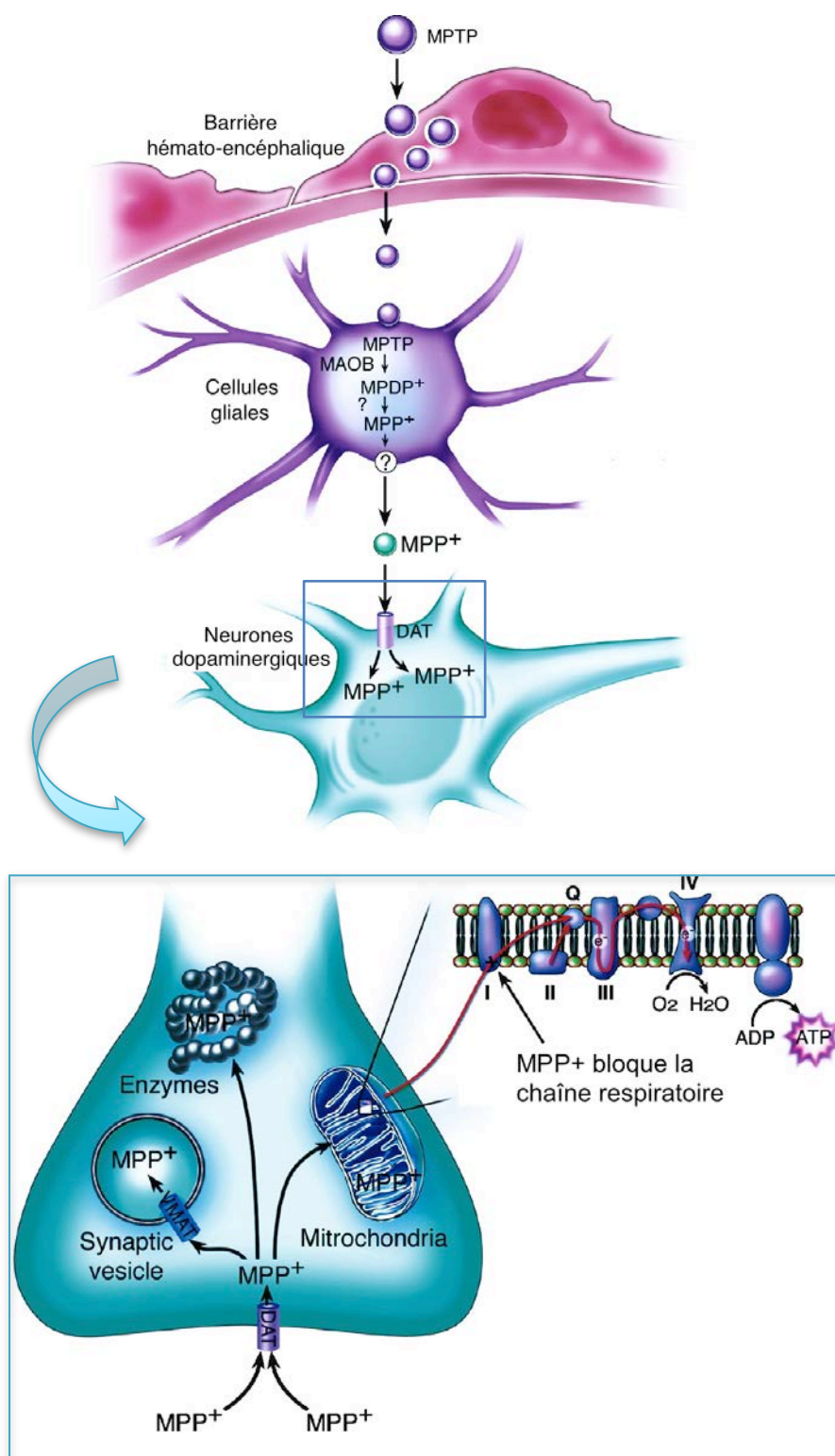
La découverte du MPTP a eu lieu en 1982 lorsqu'un groupe de jeunes toxicomanes montre tous des symptômes de la maladie de Parkinson. Quelques années plus tard, l'enquête révélera que le syndrome a été causé par l'auto-administration d'une héroïne de synthèse contaminée, lors de sa fabrication, par un sous-produit du MPTP.

Le MPTP est hautement lipophile et traverse facilement la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cependant il n'est pas toxique en lui-même. Une fois dans le cerveau, il est d'abord converti en 1-méthyl-4-phényl-2,3-dihydropyridinium (MPDP) par la monoamine oxydase B (MAO-B) dans les cellules gliales. Par oxydation spontanée, il sera transformé en son métabolite actif, l'ion 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) et sera enfin libéré dans l'espace extracellulaire (Dauer and Przedborski, 2003).

Le MPP<sup>+</sup>, qui ne peut entrer librement dans les neurones, va être pris en charge par le transporteur de la dopamine (DAT) avec lequel il a une très forte affinité. Le MPP<sup>+</sup> cytosolique libre est ensuite transporté vers les mitochondries où il va inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale conduisant à une déplétion en ATP cellulaire, une augmentation de la production de radicaux libres et à terme à la mort neuronale (**figure 2**).

Chez la souris, l'intoxication par le MPTP provoque une perte des neurones dopaminergique de la SN associée à une diminution du taux de dopamine dans le striatum. D'autres systèmes neuronaux peuvent être également atteints bien que plus faiblement en accord avec les observations réalisées chez le patient parkinsonien. Les doses et les fréquences d'injections du MPTP vont déterminer le degré et l'évolution de la dénervation dopaminergique mais également la voie de mort cellulaire enclenchée par la cellule (nécrotique ou apoptotique) (Schmidt and Ferger, 2001). Ainsi, selon le protocole expérimental utilisé, l'expérimentateur peut reproduire des stades différents de la maladie. La voie d'injection à une moindre importance et se fait le plus souvent en sous-cutanée ou en intra-péritonéale. Schmidt et Ferger ont décrit quatre modèles d'intoxication distincts chez la souris, (1) un modèle pré-symptomatique (Aubin et al., 1998), (2) un modèle aigu (Sonsalla and Heikkila, 1986), (3) un modèle subchronique (Heikkila et al., 1984) et (4) un modèle chronique (Bezard et al., 1997).

Dans cette étude, nous avons choisi le modèle aigu reposant sur un traitement aigu (injections répétées sur une courte période) avec une dose moyenne de MPTP de l'ordre de 4 x 20 mg/kg toutes les 2h. Ce protocole d'injection induit une dégénérescence dopaminergique rapide suivant une voie de mort cellulaire nécrotique (Jackson-Lewis et al., 1995) qui se rapproche du stade précoce de la maladie.



**Figure 2 : Métabolisme et mécanisme d'action du MPTP (D'après Dauer et Przedborski, 2003).**

Abréviations: I,II,III,IV: Complexe I, II, III et IV de la chaîne mitochondriale ATP: Adénosine triphosphate; DAT: transporteur de la dopamine; MAOB: monoamine oxydase B; MPP<sup>+</sup>: 1-méthyl-4-phenylpyridinium; MPTP: 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; Q : Coenzyme Q

Aucun modèle expérimental ne mime à lui seul toutes les caractéristiques de la maladie de Parkinson idiopathique, c'est-à-dire (1) la perte des neurones dopaminergiques, (2) les symptômes de déficience motrice, (3) et enfin la formation de corps de Lewy. Le syndrome parkinsonien induit par le MPTP diffère de la pathologie idiopathique de par son caractère aigu, et par l'absence de développement de corps de Lewy qui reflète une évolution lentement progressive (Hirsch et al., 1987). Néanmoins, à ce jour, le MPTP constitue le meilleur modèle expérimental de la maladie de Parkinson et le plus utilisé dans ce domaine de recherche.

## **B. Modèle ex-vivo**

Cavalière *et al.* ont mis en place un modèle de culture cellulaire organotypique permettant l'étude de maladies neurodégénératives et notamment la maladie de Parkinson. Cette culture organotypique comprend, sur une seule tranche cérébrale de rats, le cortex, le striatum, la substance noire, le corps calleux et la zone sous-ventriculaire du ventricule latéral. Cette méthode permet de conserver l'architecture des structures cérébrales mais également les connexions établies entre cellules (neurone-neurone, neurone-glie).

Cette méthode de culture permet également de préserver la voie glutamatergique allant du cortex au striatum, les projections GABAergiques allant du striatum à la substance noire et les projections dopaminergiques allant de la substance noire au striatum. Ce modèle permet des études électrophysiologiques et des analyses par immunofluorescence. Dans ce modèle, une dégénérescence des neurones dopaminergiques peut être induite par une coupure mécanique des fibres dopaminergiques allant de la substance noire au striatum ou par l'effet neurotoxique de la 6-OHDA ou du MPP<sup>+</sup> (Cavalière et al., 2010). Ainsi, ce modèle cellulaire organotypique permet l'étude de composés potentiellement thérapeutiques dans un système davantage intégratif et c'est pourquoi il sera utilisé dans ce travail de thèse.

## **C. Modèles cellulaires**

Des modèles cellulaires, qui reproduisent certaines des caractéristiques des neurones qui dégèrent dans la maladie de Parkinson, ont contribué à de nombreuses avancées dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie.

Les altérations des processus biochimiques liées à la MP sont soit induites par des mutations de gènes pertinents ou simulées par l'utilisation de toxines liées à cette pathologie comme le MPP<sup>+</sup> ou la roténone (Alberio et al., 2012).

Ces modèles *in vitro* comprennent les lignées cellulaires, les cellules primaires et les cellules souches.

*i. Les cellules souches*

En plus de la possibilité d'être utilisées en tant que nouvelle approche thérapeutique, les cellules souches représentent aussi un précieux outil pour la découverte de médicaments. Les cellules souches pluripotentes induites humaines (iPS) offrent la possibilité d'obtenir des modèles *in vitro* de neurones dopaminergiques et sont très prometteurs (Srikanth and Young-Pearse, 2014; Wheeler et al., 2015).

Cependant, leurs protocoles de différenciation sont exigeants, coûteux et de longue durée (4 à 8 semaines de différenciation) et résultent en une population souvent hétérogène. Le développement des protocoles pour produire des phénotypes d'iPS standardisés représente une avancée remarquable vers l'obtention de lignées de cellules souches patients-spécifiques pour l'étude de divers mécanismes de la maladie (Hu et al., 2015).

*ii. Les cellules primaires*

Des dérivés des fibroblastes humains primaires pour étudier les mécanismes de la maladie sont une autre approche pour le développement de lignées cellulaires pour modéliser la MP. Ces cellules sont utiles pour étudier la pathogenèse de la MP, en particulier lors de l'exploration du rôle de gènes spécifique dans le but de déterminer la sensibilité des neurones à différentes conditions de stress. Mais cette approche est limitée par le fait que les fibroblastes, à long terme, deviennent sénescents, peuvent se transformer et / ou subir une sélection clonale (Schüle et al., 2009).

*iii. Les lignées cellulaires tumorales*

De nombreuses lignées cellulaires sont utilisées comme modèles. Leurs intérêts sont leur facilité de culture comparativement aux cellules primaires et la possibilité de les modifier génétiquement plus aisément. La lignée cellulaire PC12 est facile à manipuler et relativement homogène mais ne sont pas d'origine humaine, ce qui rend difficile les extrapolations inter-espèce dans la réponse aux traitements de substances toxiques (Li *et al.* 2010; Xilouri and Stefanis, 2011). Des lignées plus proches des cellules neuronales comme les cellules de neuroblastome SH-SY5Y sont également utilisées pour étudier les maladies neurodégénératives. Cette lignée peut être différenciée en neurones dopaminergiques et est donc utilisée comme modèle de la maladie de Parkinson (Xie et al., 2010). Cependant, leur différenciation en neurones post-mitotiques est très difficile (Constantinescu et al., 2007) et le caractère tumoral de ces cellules peut infléchir les phénotypes obtenus.

*iv. Les lignées cellulaires non tumorales*

De ce fait, des lignées de cellules non tumorales ont été générées à partir de tissu foetal sain immortalisé et pouvant se différencier en une population homogène de neurones dopaminergiques. Les exemples sont les cellules ReNcell (Donato et al., 2007), dérivées du mésencéphale ventral foetal humain et immortalisées par v-myc, les cellules MESC2.10 (Lotharius, 2002), ainsi que leur sous-clone LUHMES (Lotharius, 2005), qui peuvent être utilisés comme modèle génétique et toxique de la MP.

Les cellules LUHMES sont dérivées d'un tissu mésencéphalique humain de 8 semaines. Ce sont des précurseurs neuronaux (**Figure 3**) immortalisés par l'oncogène v-myc sous le contrôle d'un promoteur de tétracycline (Lotharius, 2002). Le caryotype de cette lignée cellulaire montre un set normal de chromosomes et un génotype féminin (Paul et al. 2007).

Après l'inactivation de l'expression du transgène v-myc par l'ajout de tétracycline (Système d'expression génique Tet-Off), les cellules LUHMES se différencient en une population homogène de neurones post-mitotiques de manière irréversible et électriquement actifs en 5 jours. Ceci est corroboré par l'augmentation de l'ARNm du marqueur de neurones post-mitotiques Fox3/NeuN parallèlement à la diminution de celui de la *cyclin-dependant kinase1* (Cdk1). Ces cellules possèdent des canaux sodiques et potassiques fonctionnels qui leur permettent au 5<sup>ème</sup> jour de différenciation d'être électriquement actifs de façon spontanée (Scholz et al., 2011a).

Lors de leur différenciation les cellules LUHMES vont développer des caractéristiques neuronales telles que la formation d'un vaste réseau de neurites (**Figure 4**). En ce sens, le gène de la  $\beta$ -tubuline est up-régulé de façon progressive lors de la différenciation et atteint son maximum au 5<sup>ème</sup> jour.

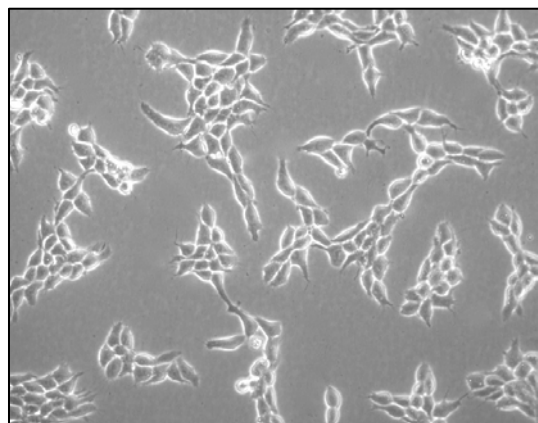
Outre leurs caractéristiques neuronales générales, les cellules vont acquérir de très nombreuses caractéristiques de neurones dopaminergiques.

Scholz *et al.* ont étudié cinq différents marqueurs dopaminergiques (VMAT2, DAT, DRD1, DRD2 et TH). Seul VMAT2 n'est pas détecté dans les cellules précurseurs. L'expression de ces cinq marqueurs augmente progressivement lors de la différenciation, bien qu'ils atteignent leur maximum à différents moments, tous l'ont atteints au 6<sup>ème</sup> jour.

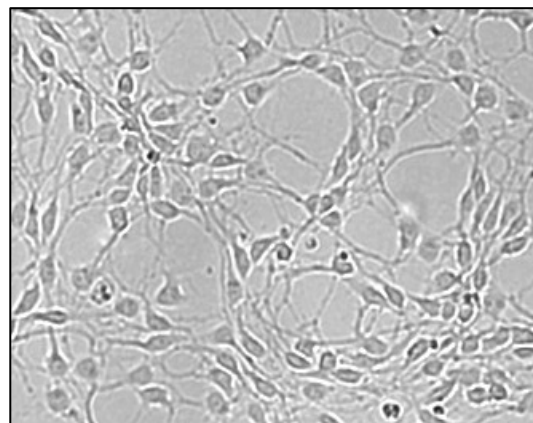
L'expression de la TH, qui est l'un des marqueurs les plus importants des neurones dopaminergiques matures, atteint son maximum au 5<sup>ème</sup> jour alors que le DAT atteint son maximum dès le 2<sup>ème</sup> jour (Scholz et al., 2011a).

Enfin, il est à noter qu'en ce qui concerne le MPP+, une toxine très utilisée dans les études sur la maladie de Parkinson, les cellules LUHMES ont un comportement semblable à celui des cellules primaires.

En conclusion, ces études ont clairement démontré que les cellules LUHMES étaient une des meilleures lignées cellulaires pour caractériser les modes d'action des substances neurotoxiques sur la mort cellulaire dans la maladie de Parkinson (Krug et al., 2013; Scholz et al., 2011a).



**Figure 3 : Cellules LUHMES indifférenciées**



**Figure 4 : Cellules LUHMES différenciées**

## II. Mécanismes moléculaires liés à la dégénérescence

### 1. Complexe mitochondrial

La découverte du mécanisme d'action du MPTP via l'action du MPP<sup>+</sup> sur le complexe I de la mitochondrie a souligné un rôle de la mitochondrie dans la pathogénèse de la MP. Cette hypothèse a été confirmée par l'action d'autres substances toxiques sur les neurones dopaminergiques comme la roténone ou l'annonacine (Lannuzel et al., 2003; Ramsay et al., 1986). Dès 1990, des chercheurs observent une baisse de l'activité du complexe I de la chaîne mitochondriale d'environ 40% et une altération du taux d' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase (Mizuno et al., 1994; Schapira et al., 1990).

Cependant, bien que le déficit du complexe I mitochondrial semble être spécifique de la MP, il n'est pas retrouvé chez tous les patients parkinsoniens.

De plus, malgré des recherches intensives sur le génome mitochondrial, aucune étude n'a permis de trouver une mutation spécifique qui serait responsable du développement de la MP, bien que les gènes touchés dans les formes familiales de la maladie ( $\alpha$ -synucléine, parkin, PINK1, DJ-1 et LRRK2) ont tous été associés avec des altérations des fonctions mitochondriales (Schapira and Jenner, 2011; Schapira, 2011, 2008).

## 2. Inflammation et excitotoxicité

De nombreuses études ont été réalisées pour montrer le rôle de l'inflammation dans la pathogenèse et la progression de la MP. Il a été montré que les toxines qui touchent directement les neurones dopaminergiques, telles que la 6-OHDA, le MPTP et la roténone induisent une activation de la microglie qui va libérer des cytokines inflammatoires. Mais cette microglie activée peut également sécréter des molécules cytotoxiques comme du peroxyde d'hydrogène ou des protéases capables d'activer les voies de signalisation de l'apoptose (Iravani et al., 2012). Tous les médiateurs inflammatoires comme le *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ), l'interleukine (IL)-1 $\beta$ , le monoxyde d'azote ou les ROS sécrétés par la microglie modulent la progression de la mort neuronale dans la maladie de Parkinson (Hirsch and Hunot, 2009). C'est l'utilisation de lipopolysaccharide (LPS) dans des modèles *in vitro* et *in vivo* qui ont permis de montrer l'activation gliale. Par exemple, l'injection de LPS dans le striatum de rats entraîne une augmentation du taux de médiateurs inflammatoires dont les cyclo-oxygénases-2 (COX-2) et la NO synthase inductible (iNOS) qui vont conduire à une perte de neurones dopaminergiques (Hunter et al., 2007).

De manière intéressante, l'ensemble des médiateurs inflammatoires ou toxiques sécrétés par les cellules microgliales et astrocytaires exercent une activité toxique préférentiellement sur les neurones de type dopaminergique et posent la question d'une sensibilité particulière des neurones dopaminergiques (Glass et al., 2010). Cette activité toxique est associée à une libération de glutamate et une augmentation de l'excitotoxicité (Barger et al., 2007).

L'excitotoxicité est le processus pathologique par lequel les neurones sont endommagés et tués après une stimulation excessive des récepteurs glutamatergiques. La libération du glutamate va être responsable d'une surcharge de calcium dans le cytosol qui va conduire à des dommages mitochondriaux et à la formation de ROS. La mort neuronale induite par le glutamate a ensuite été baptisée « oxytosis ».

Il a été observé que l'inhibition du complexe I déclenche l'accumulation de glutamate dans les cultures primaires d'astrocytes (McNaught and Jenner, 2000). De plus, l'agrégation d' $\alpha$ -synucléine, principale caractéristique pathologique de la MP augmente la fréquence des courants synaptiques miniatures spontanés médiées par les récepteurs du glutamate ce qui augmente la transmission glutamatergique pré- et post-synaptique aggravant ainsi l'homéostasie calcique de neurones corticaux primaires (Hüls et al., 2011).

De nombreuses études montrent clairement que la neuroinflammation et l'excitotoxicité du glutamate s'alimentent l'un et l'autre créant un véritable cercle vicieux qui fini par aggraver la dégénérescence nigro-striée dans la maladie de Parkinson (Barger et al., 2007; Lee, 2013; Noda, 2013)

### 3. Système ubiquitine-protéasome

Pour assurer son homéostasie la cellule doit à tout moment pouvoir éliminer sélectivement les protéines intracytoplasmiques endommagées. Cette élimination est assurée par le système ubiquitine-protéasome (UPS). Ces protéines sont «marquées» par une chaîne de molécules d'ubiquitine. La poly-ubiquitinylation des protéines altérées permet leur transfert puis leur dégradation par le protéasome. Le protéasome est un complexe de protéases qui élimine les protéines altérées (agrégation, oxydation, ou mauvais repliement de la protéine) mais ce système peut être dépassé ou peut dysfonctionner ce qui va engendrer un stress oxydant par accumulation de protéines.

La présence de plusieurs protéines et notamment de l'alpha-synucléine dans les corps de Lewy a conduit à l'hypothèse d'une possible implication du système UPS dans la pathogenèse de la MP.

Les mutations de l'alpha-synucléine, de la parkine et de l'UCH-L1 fournissent des arguments supplémentaires en faveur de l'hypothèse d'un dysfonctionnement ou d'une insuffisance de l'UPS, provoquant l'accumulation de protéines et la mort cellulaire (Tofaris et al., 2001).

Plusieurs travaux mettant en évidence une altération des sous-unités du protéasome et une diminution de son activité dans la SN de patients ont également étayé cette hypothèse (McNaught and Jenner, 2001).

### 4. Le stress oxydant

Depuis les années 80, un grand nombre de publications ont placé le stress oxydant comme un élément central de la pathogenèse des maladies neurodégénératives.

Bien que l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) soit crucial pour la vie de la plupart des organismes, il peut, dans certaines conditions, devenir délétère. Au cours de la respiration cellulaire, l'oxygène est transformé par un apport contrôlé de 4 protons en deux molécules d'eau. Cependant, il peut y avoir une réduction incomplète de l' $O_2$  ce qui donne naissance à des radicaux libres.

Parmi les différentes classes de radicaux libres, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont les radicaux les plus abondants. Cette classe de radicaux libres regroupe des radicaux qui dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron, comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), le radical peroxy ( $RO_2^{\cdot}$ ), le radical alkoxy ( $RO^{\cdot}$ ) et le radical perhydroxyle ( $HO_2^{\cdot}$ ). Le monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ ) et le dioxyde d'azote ( $NO_2^{\cdot}$ ) appartiennent à une autre classe de radicaux libres, les espèces réactives de l'azote (RNS).



Les ROS et RNS peuvent être converties en espèces réactives qui ne sont pas des radicaux libres telles que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'acide hypobromeux (HOBr) et le nitroperoxyde (ONOOH). Il est à noter que ces molécules sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres dérivés de l'oxygène et leurs précurseurs est appelé ROS. Parmi ces ROS, les radicaux  $O_2^{\cdot-}$  et  $OH^{\cdot}$  sont considérés comme les plus réactifs (Kim et al., 2015).

## A. Sources des ROS

Plusieurs sources, soit exogène ou endogène, contribuent à la formation de ROS intracellulaire. Les sources exogènes sont les rayons ultra-violet (UV), les rayonnements ionisants, les polluants atmosphériques et des produits chimiques (Trachootham et al., 2008)

### *i. La mitochondrie*

De nombreuses études suggèrent que la mitochondrie est la source principale de ROS endogènes. Elle est le plus gros producteur du radical hydroxyl  $O_2^{\cdot-}$  qui se produit au niveau de deux sites précis de la chaîne de transport des électrons, soit au niveau du complexe I et III, soit respectivement la NADH-coenzyme Q oxydoréductase et la coenzyme Q cytochrome C oxydoréductase (Halliwell, 2006).

### *ii. Les peroxysomes*

Les peroxysomes sont une autre source de ROS intracellulaire dont le produit majeur est l' $H_2O_2$ . La genèse de ROS se fait principalement par la consommation d'oxygène dans le cadre des processus enzymatiques dans les peroxysomes. Les enzymes antioxydantes endogènes dont la catalase sont chargées de contrôler les taux de peroxyde d'hydrogène dans la cellule.

### *iii. La NADPH oxydase*

La NADPH oxydase est un complexe enzymatique activé par les cellules immunitaires telles que les phagocytes ou les macrophages. Lors de son activation, la NADPH génère des ROS en transférant son électron sur l'oxygène qui va résulter en la formation du radical hydroxyl et de l' $H_2O_2$  (Kang et al., 2012).

#### *iv. La NO-synthase*

Enfin, il y a également une autre voie métabolique dépendante de l'oxygène qui contribue à l'élimination des microorganismes pathogènes, soit l'induction d'une enzyme NO-synthase (NOS). En effet, certaines cellules phagocytaires sont capables, après activation de la NOS inductible, de produire des dérivés nitrés, tels que le NO $\cdot$ . Ainsi, la production simultanée de NO $\cdot$  et de O $_2^{\cdot-}$  dans le milieu s'avère très nocive puisqu'il y a formation de ONOO $^-$ , un produit très réactif et qui est responsable de la majorité des effets dommageables attribués au NO $\cdot$  (Favier, 2006).

### **B. Les mécanismes antioxydants**

Ils existent de nombreux mécanismes de défenses antioxydants dans les cellules pour essayer de maintenir l'homéostasie oxydative dont des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.

#### *i. Les superoxydes dismutases*

Tout d'abord, il y a les superoxydes dismutases (SOD) dont le rôle est d'éliminer le radical hydroxyle par une réaction de dismutation qui produit une molécule d'oxygène et une molécule de H $_2$ O $_2$  à partir de deux O $_2^{\cdot-}$ . La réaction de dismutation est catalysée par la présence au coeur de l'enzyme d'un métal qui est l'élément caractéristique des différentes isoformes. Ainsi on distingue les SOD à manganèse situées dans la mitochondrie, (Mn-SOD), les SOD à cuivre-zinc (Cu ,Zn-SOD) retrouvées dans le cytoplasme et les SOD extracellulaires (EC-SOD) localisées dans les fluides extracellulaires (Johnson and Giulivi, 2005).

#### *ii. La catalase*

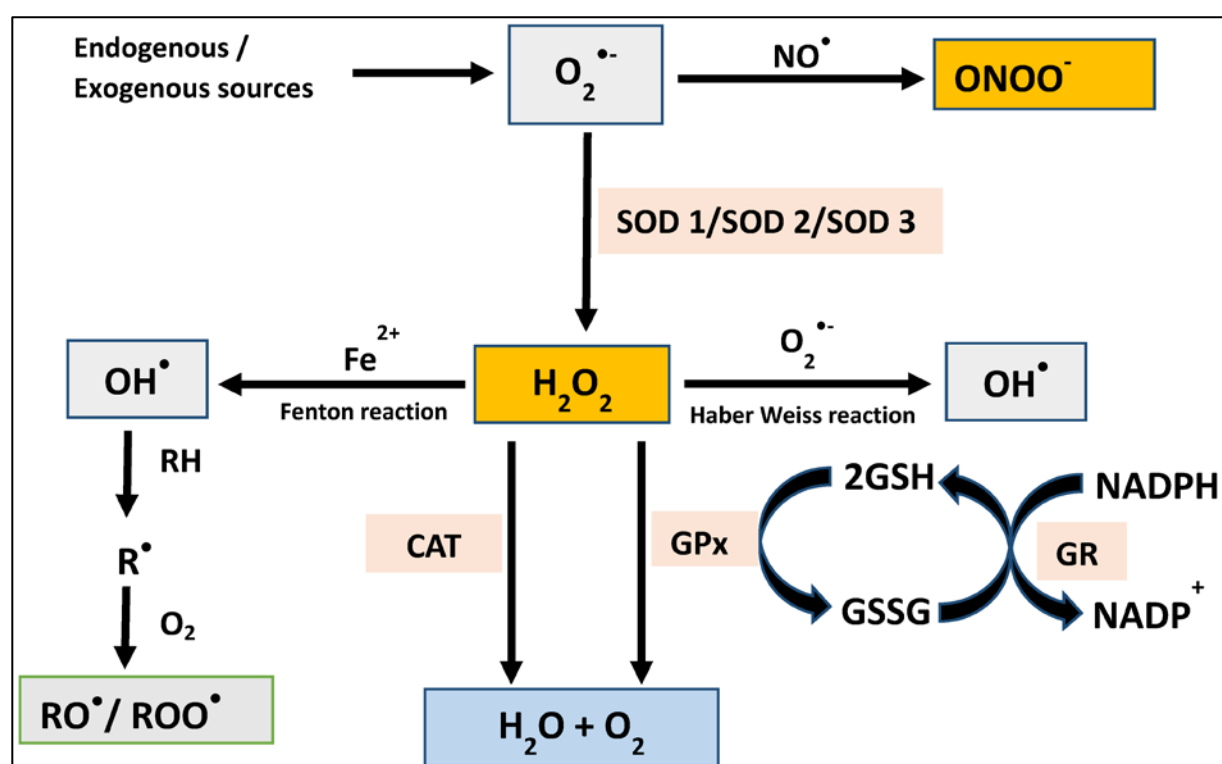
La prise en charge de l'H $_2$ O $_2$  produit par la réaction de dismutation de la SOD va se faire dans un premier temps par la catalase (CAT). La catalase est une enzyme tétramérique formée de quatre sous-unités identiques comportant chacun un groupe hème. Cette enzyme catalyse la transformation de l'H $_2$ O $_2$  en eau. La catalase est considérée comme une des enzymes dotées d'une remarquable efficacité, à un tel point qu'elle est insaturable. Il a également été montré qu'elle possède un rôle important dans le développement d'une réponse adaptative face au stress oxydant (Esposito et al., 2003).

### iii. La glutathion peroxydase

Dans un second temps, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  va être prise en charge par la glutathion peroxydase (GPx). Cette enzyme est formée de quatre sous-unités identiques comportant chacune un atome de sélénium, ce dernier étant essentiel pour l'activité de cette enzyme. Il existe, au moins, cinq isoformes de cette enzyme et leur quantité dépend de leur localisation.

Ces enzymes catalysent la réduction de différents hydroperoxydes organiques (ROOH et  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en utilisant le glutathion (GSH) comme donneur d'électrons (Arthur, 2000).

Finalement, au niveau cellulaire, c'est l'association et la complémentarité de ces trois enzymes qui confèrent à la cellule une protection efficace contre les ROS (**Figure 5**).



**Figure 5 : Les différents ROS et les mécanismes antioxydants (Ajuwon et al. 2015)**

Abréviations:  $\text{O}_2^{\bullet-}$ : anion superoxyde;  $\text{OH}^\bullet$ : radical hydroxyle;  $\text{ONOO}^-$ : nitroperoxyde; CAT: catalase;  $\text{Fe}^{2+}$ : Fer ferreux; GPx: Glutathion peroxydase; GR: Glutathion Réductase;  $\text{H}_2\text{O}_2$ : Peroxyde d'hydrogène;  $\text{RO}^\bullet$ : radical peroxyde; SOD: Superoxyde dismutase

### C. Effets physiologiques des ROS

Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote ont été généralement considérées comme étant des molécules hautement réactives et cytotoxiques, cependant, une large littérature montre qu'en plus de leurs effets délétères, les ROS participent aux processus physiologiques d'une manière bien contrôlée.

Les ROS sont impliqués dans les réponses physiologiques importants, tels que la défense contre les agents pathogènes environnementaux ou dans la signalisation cellulaire (Pourova et al., 2010). Les ROS et les RNS sont capables d'influencer les processus physiologiques en raison de leur capacité à modifier l'activité de molécules contenant des domaines sensibles à des conditions d'oxydo-réduction telle que les enzymes ou les facteurs de transcription (Dröge, 2002).

De nombreux travaux suggèrent que les antioxydants peuvent être des régulateurs importants de la réponse cellulaire dans des conditions hypoxiques. Bien que la base moléculaire de cette régulation ne soit pas encore totalement comprise, des études suggèrent que la libération de ROS dans ces conditions fonctionne comme un important régulateur physiologique de « hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) ».

Ce dernier augmente dans des conditions d'hypoxie, cette augmentation engendre une augmentation de ROS qui par un rétrocontrôle négatif stabilise HIF-1 $\alpha$  et inhibe la production de nouveaux ROS (Guzy et al., 2005).

Des données récentes ont montré que les ROS mitochondriaux contribuent à la réponse phagocytaire du système immunitaire innée à la suite de l'activation d'un sous-ensemble de récepteurs Toll-like (TLR 1, TLR2 et TLR4) (West et al., 2011). Ces ROS mitochondriaux sont également impliqués dans la réponse inflammatoire en activant les récepteurs NOD. Une fois activés ces récepteurs vont réguler la maturation et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$  (Bulua et al., 2011).

Un autre rôle physiologique des ROS est la régulation du tonus vasculaire par la guanylate cyclase (GMPc). La GMPc peut être activé à la fois par NO $\cdot$  et H $_2$ O $_2$ . Le GMPc formé est utilisé comme un amplificateur intracellulaire et un second messager pour moduler la fonction des protéines kinases, les canaux ioniques et d'autres cibles physiologiques importantes, y compris la régulation du tonus du muscle lisse et l'inhibition de l'adhésion des plaquettes (Valko et al., 2007).

#### **D. Effets toxiques des ROS**

De nombreuses études suggèrent un lien entre les ROS et la physiopathologie de nombreuses maladies. Cependant, ce lien peut être parfois controversé car la mesure directe du stress oxydant est très difficile, du fait de la courte demi-vie des radicaux libres et des autres espèces réactives. Ainsi, les mesures du stress oxydant sont des mesures indirectes basées sur les différents produits des dommages causés par les ROS sur les protéines, l'ADN et les lipides.

*i. Oxydation des protéines*

Les protéines sont les principales molécules impliquées dans les processus fonctionnels et sont donc retrouvées en abondance dans les systèmes biologiques, faisant d'elles, une cible importante des ROS.

Tous les acides aminés des protéines peuvent être attaqués par les espèces réactives (ROS, RNS et électrophiles), cependant les groupes thiol de la cystéine sont les plus sensibles. La sensibilité du groupe thiol provient des propriétés chimiques de la cystéine qui confère au groupe thiol des propriétés spécifiques dont une nucléophilie, une haute affinité de liaisons pour les métaux et la capacité à former des liaisons disulfures.

Chaque niveau de structure des protéines, de la primaire à la quaternaire, peut être altéré quand les protéines sont attaquées par les ROS, causant des changements structurels majeurs dans la conformité des protéines. Ces dommages sont la plupart du temps irréparables ainsi, les modifications oxydatives de la structure de la protéine peuvent avoir un large éventail de conséquences fonctionnelles, dont la fonction des récepteurs, des enzymes, des protéines de transport et générer de nouveaux antigènes qui peuvent provoquer une réponse immunitaire (Dalle-Donne et al., 2006). Bien que ces protéines malformées sont normalement dégradées par le système ubiquitine-protéasome, ce système peut ne pas être totalement efficace ou endommagé par le stress oxydant lui-même, accélérant de ce fait l'accumulation de ces protéines (Butterfield and Dalle-Donne, 2014). Ces agrégats protéiques peuvent être très cytotoxiques et des niveaux accrus d'agrégats ont été observés chez des patients souffrant de troubles liés à l'âge comme la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer et les cancers (Avery, 2011).

*ii. Oxydation de l'ADN*

Les ROS et notamment le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) généré pendant le stress oxydant peut réagir avec la molécule d'ADN est causé des modifications dans tous ses composants (purine, pyrimidine, squelette désoxyribose-phosphate), causant des dommages tels que des lésions dans les bases ou les sucres lésions ou encore des cassures simple-brin et double-brin. Ce genre de dommages est l'une des causes du vieillissement cellulaire et un des principaux instigateurs de cancer (Halliwell and Gutteridge, 2015). Bien que le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) soit moins réactif, il se diffuse plus facilement et va donc être impliqués dans la formation de bases oxydées via la réaction de Fenton et la réaction d'Haber-Weiss (**Figure 5**). Ces dommages, non réparés avant la réplication de l'ADN, peuvent induire des mutations de l'ADN, des erreurs de réplication et une instabilité génomique pouvant provoquer la mort cellulaire.

### *iii. Peroxydation lipidique*

La membrane cellulaire est très sensible à l'attaque des ROS car les acides gras formant les phospholipides de la membrane sont très sensibles à l'oxydation. De nombreuses espèces réactives telles que  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH\cdot$ ,  $RO\cdot$  et  $ONOOH$  sont tous des potentiels initiateurs de la peroxydation lipidique. Elle se déroule en trois étapes, au cours de l'initiation, l'acide gras contenant les chaînes à double liaison carbone est oxydé par un radical libre pour produire un radical lipidique qui sera oxydé pour produire le radical peroxyde.

Ce radical peut ensuite oxyder un acide gras voisin pour devenir un hydroperoxyde stable. L'acide gras voisin va à son tour devenir un radical lipidique qui va propager le processus oxydatif au sein de la membrane. La phase de terminaison consiste en la transformation des hydroperoxydes lipidiques formés en une variété de produits finis relativement stables que sont le malondialdéhyde (MDA), le trans-4-hydroxy-2-nonéal (4-HNE) et le 2-propénal (acroléine). La peroxydation lipidique va avoir pour conséquence une altération du fonctionnement des membranes pouvant conduire à la mort cellulaire.

## **E. Facteurs de susceptibilités des neurones dopaminergiques**

Les neurones dopaminergiques sont particulièrement sensibles au stress oxydant et par conséquent à la mort cellulaire qu'il peut engendrer. De nombreux facteurs sont responsables de cette susceptibilité notamment le métabolisme de la dopamine, la présence de neuromélanine et des taux diminués de GSH. De plus, le cerveau contient de fortes concentrations d'acides gras polyinsaturés, qui, dans des conditions de stress oxydatif vont subir une peroxydation et formés des substances toxiques. Enfin, des niveaux élevés de fer observés dans la substance noire participent également à la susceptibilité des neurones dopaminergiques au stress oxydant.

### *i. La dopamine*

La dopamine est une molécule instable qui va s'auto-oxyder pour former des quinones et des radicaux libres. Cette réaction est catalysée par les métaux, l'oxygène ou par des enzymes comme la tyrosinase. Les produits d'oxydation de la dopamine, les quinones peuvent contribuer à la neurodégénérescence.

Ces quinones peuvent se cycliser pour former des aminochromes, produits très réactifs et qui conduit à la formation de l'anion superoxyde et à la diminution de la NADPH.

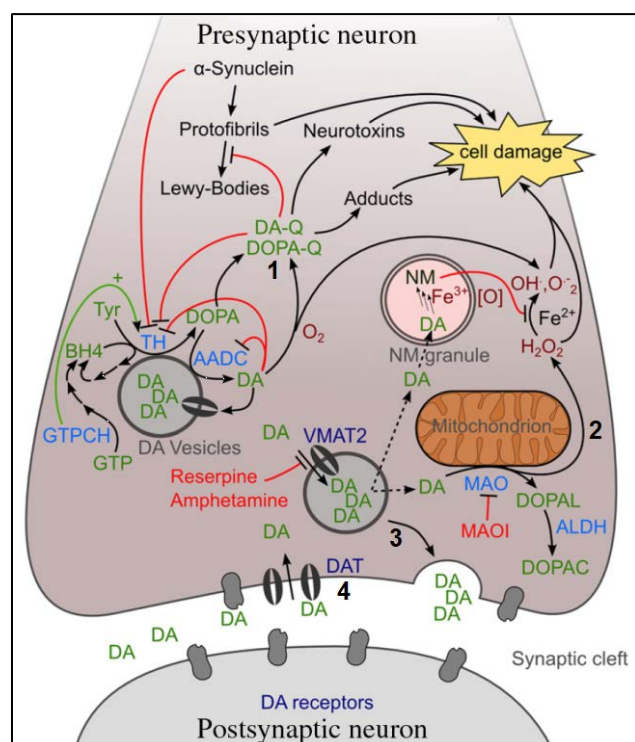
Ces aminochromes peuvent former des adduits avec des protéines telles que l'alpha-synucléine et sont les précurseurs de la neuromélanine qui peut également contribuer à la neurodégénérescence par le déclenchement d'une neuroinflammation (Norris et al., 2005; Zecca et al., 2008) (**1. Figure 6**).

Les enzymes du métabolisme de la dopamine comme les monoamines oxydases (MAO) ou les catéchol-O-méthyl transférase (COMT) peuvent également avoir un rôle dans la toxicité de la dopamine. En condition normale, les niveaux de dopamine sont régulés par le métabolisme oxydatif de la MAO-A, qui est principalement localisée dans les neurones catécholaminergiques.

Cependant, avec la dégénérescence dopaminergique qui se produit dans la MP et le vieillissement, la MAO-B située dans les cellules gliales augmente et devient l'enzyme prédominante pour métaboliser la dopamine (Youdim et al., 2006).

Le catabolisme de la dopamine par la MAO-B engendre une molécule de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le peroxyde d'hydrogène entre facilement par les membranes dans les neurones dopaminergiques voisins où il peut réagir avec le fer ferreux Fe<sup>2+</sup> pour former un radical hydroxyle (Kumar and Andersen, 2004). Cette hypothèse a été confirmée par le fait que la surexpression inducible de la MAO-B dans des astrocytes de souris adulte induit une perte sélective et progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire (Mallajosyula et al., 2008). (**2. Figure 6**).

Le transport et le stockage de la dopamine peuvent également contribuer à l'augmentation de la production de ROS et le dysfonctionnement cellulaire. Normalement, la dopamine est séquestrée dans les vésicules de stockage par un processus de transport actif qui nécessite VMAT2 (*vesicular monoamine transporter 2*) en vue de la libération du neurotransmetteur après la dépolarisation. Ainsi, VMAT2 maintient les niveaux de dopamine cytoplasmique sous contrôle empêchant la génération de ROS. Il a été montré que la surexpression de VMAT2 confère une protection contre la toxicité du MPTP tandis que l'inhibition pharmacologique ou le KO de VMAT2 dans les neurones dopaminergiques sont plus sensibles au toxique (Uhl et al., 2000) (**3. Figure 6**). Pour finir, la recapture de la dopamine libérée dans la fente synaptique nécessite le DAT. Des perturbations de cette recapture vont impacter le niveau de dopamine cytoplasmique qui est susceptible d'être oxydé (Hastings, 1995) (**4. Figure 6**).



**Figure 6 : Métabolisme toxique de la dopamine (d'après Meiser et al., 2013).**

**Effet des quinones**

**Effet du catabolisme par la MAO-B**

**Rôle de VMAT**

**Rôle du DAT**

Abréviations : DA : dopamine ; DA-Q : Dopamine quinone ; DOPA : Dihydrophénylalanine ; DOPA-Q : DOPA quinone ;  $Fe^{2+}$ : fer ferreux ;  $H_2O_2$ : Peroxyde d'hydrogène ; MAO: Monoamine Oxydase ; TH: Tyrosine Hydroxylase ; VMAT2 : (vesicular monoamine transporter 2)

## ii. La neuromélanine

La neuromélanine est un pigment polymère synthétisé dans les neurones et qui contient de la dopamine, des métabolites oxydés de la dopamine, ainsi que des protéines et des lipides (Double, 2012). Bien que son rôle biologique ne soit pas complètement élucidé, plusieurs hypothèses ont été proposées pour essayer d'élucider son importance dans la maladie de Parkinson. L'une de ces hypothèses suggère que la neuromélanine augmente la vulnérabilité cellulaire, par l'existence d'une corrélation entre la proportion de ce pigment dans différentes régions du cerveau et la perte neuronale (Kastner et al., 1992).

Une autre hypothèse a été proposée sur la base de changements morphologiques de la neuromélanine (augmentation de la densité, modifications dans sa structure et diminution de la teneur en lipides) plutôt que de la quantité (Halliday et al., 2005) mais qui va également dans le sens de l'augmentation de la vulnérabilité des neurones dopaminergiques.

La neuromélanine peut également jouer un rôle dans la MP par son interaction avec les métaux et notamment le fer car elle en est un lieu de stockage. Il a d'ailleurs été observé que cette neuromélanine, dans la SN de patients parkinsoniens, contenait des taux très élevés de fer pouvant potentiellement entraîner une augmentation du stress oxydant.

Elle peut augmenter la vulnérabilité neuronale par son interaction avec l'alpha-synucléine. Il a été observé que l'alpha-synucléine est surexprimée dans les neurones à neuromélanine (Xuan et al., 2011).



Enfin, la neuromélanine libérée par les neurones en dégénérescence peut contribuer au processus neurodégénératif par activation de la microglie (Karlsson and Lindquist, 2013).

### *iii. Les lipides*

Le cerveau possède des concentrations élevées en acides gras polyinsaturés tels que l'acide docosahexaénoïque et l'acide arachidonique, par rapport à d'autres organes. Ces acides gras vont être très sensibles au stress oxydant et notamment à la peroxydation. Cette peroxydation lipidique peut entraîner des dommages neuronaux et contribue à la progression de la maladie de Parkinson. Des études ont montré une augmentation des produits formés par la peroxydation comme le malondialdéhyde et le HNE dans la SN de patients parkinsoniens, tandis que les acides gras polyinsaturés sont diminués (Montine et al., 2004). De plus, des niveaux élevés de HNE sont également détectés dans le liquide céphalorachidien (LCR) de ces patients (Yoritaka et al., 1996).

### *iv. Le glutathion*

Le GSH est un tripeptide constitué par le glutamate, la cystéine et la glycine, avec le groupe réactif thiol de son résidu cystéine servant d'antioxydant efficace. Le GSH est synthétisé dans le cytoplasme par un échange cystéine/glutamate via le système Xc<sup>-</sup>, mais doit être transporté vers les mitochondries où il fonctionne comme une molécule antioxydante en prenant en charge les molécules de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formées au cours du métabolisme cellulaire normal. Les niveaux de GSH sont finement régulés dans les neurones sains, et des altérations de ces niveaux physiologiques peuvent induire la mort cellulaire.

L'analyse de cerveaux post-mortem de patients parkinsoniens montre une diminution de la quantité de glutathion réduit (GSH) par rapport au glutathion oxydé (GSSG) dans la SN (Pearce et al., 1997). La déplétion en GSH est le premier indicateur de stress oxydant dans la maladie de Parkinson suggérant une augmentation concomitante des ROS.

Bien que le GSH ne soit pas le seul antioxydant diminué dans la MP, l'amplitude de sa diminution semble être corrélée avec la sévérité de la maladie (Perry and Yong, 1986).

De plus, l'administration systémique du buthionine sulfoximine (BSO), un inhibiteur de la glutamyl-cystéine synthase, enzyme impliqué dans la formation du GSH, chez des souris, engendre une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SN non généralisée à d'autre population neuronale (Andersen et al., 1996; Garrido et al., 2011).

La réduction de l'activité du complexe I mitochondrial dans la SN est considérée comme un événement biochimique majeur dans la pathogénèse de la maladie (Jenner, 1993). La diminution de GSH, dans la MP, est associée à une baisse de l'activité du complexe I mitochondrial (Chinta et al., 2007).

Toutes ces données montrent que les neurones dopaminergiques sont particulièrement sensibles aux effets des perturbations du système oxydo-réduction *via* la déplétion de GSH.

En plus de ces nombreux facteurs, qui expliquent une certaine susceptibilité des neurones dopaminergiques au stress oxydant, augmentant ainsi les mécanismes de mort cellulaire, les niveaux de fer intracellulaire participent également à ce processus. Le fer étant un élément central de ce travail de thèse, je détaillerai dans le chapitre suivant, son métabolisme au sein du cerveau et sa régulation avant de discuter de la conséquence du dérèglement de son homéostasie dans la maladie de Parkinson.

### **III. L'implication du fer dans la neurodégénérescence**

#### **1. Généralités**

Le fer joue un rôle fondamental dans une variété de processus biologiques importants dont le transport d'oxygène (par le hème de l'hémoglobine), dans la biosynthèse de l'ADN (en tant que cofacteur de la ribonucléotide réductase), et dans la génération d'ATP (en tant que cofacteur de nombreuses protéines dans la chaîne du cycle de l'acide citrique et de transport d'électrons). Dans le cerveau, le fer est essentiel pour le maintien des besoins métaboliques et énergétiques du tissu neuronal, pour la production de myéline et pour la synthèse des neurotransmetteurs.

Ces fonctions reposent sur son potentiel redox, qui permet le passage réversible du fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) au fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) catalysant les réactions de transfert d'électrons. Cependant, cet état redox-actif peut générer des espèces réactives de l'oxygène, conduisant à un stress oxydant et à l'initiation des voies de signalisation de survie et de mort cellulaire.

Par conséquent, les cellules doivent maintenir une quantité suffisante et non toxique de fer qui nécessite la coordination d'une grande variété de gènes, qui contrôlent étroitement le métabolisme du fer systémique (pour revue, Ganz and Nemeth, 2012) et celui du fer intracellulaire (pour revue, Hentze et al., 2010).

#### **2. Métabolisme du fer périphérique**

L'homéostasie du fer périphérique implique l'action de quatre types cellulaires différents : les entérocytes intestinaux, les érythroblastes de la moelle osseuse, les macrophages et les hépatocytes. La seule voie d'acquisition du fer se fait par l'apport alimentaire sous forme de fer ferreux et d'hème (environ 1 à 2 mg par jour).

L'absorption du fer commence à la membrane apicale des entérocytes intestinaux. Le fer ferreux est d'abord absorbé suite à la réduction du fer ferrique par le cytochrome b duodénal (Dcytb) puis par son importation cytosolique grâce au *divalent metal ion transporter-1* (DMT1).

L'entérocyte est également capable d'absorber l'hème grâce au *heme carrier protein-1* (HCP-1) et de libérer le fer ferreux qu'il contient grâce à l'hème oxygénase 1 (HO-1). Le  $Fe^{2+}$ , une fois dans la cellule, est soit oxydé par la chaîne H de la ferritine et stocké dans la ferritine, soit exportés par la ferroportine au niveau de la membrane basale. L'exportation du fer des entérocytes vers les liquides extracellulaires nécessite l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique.

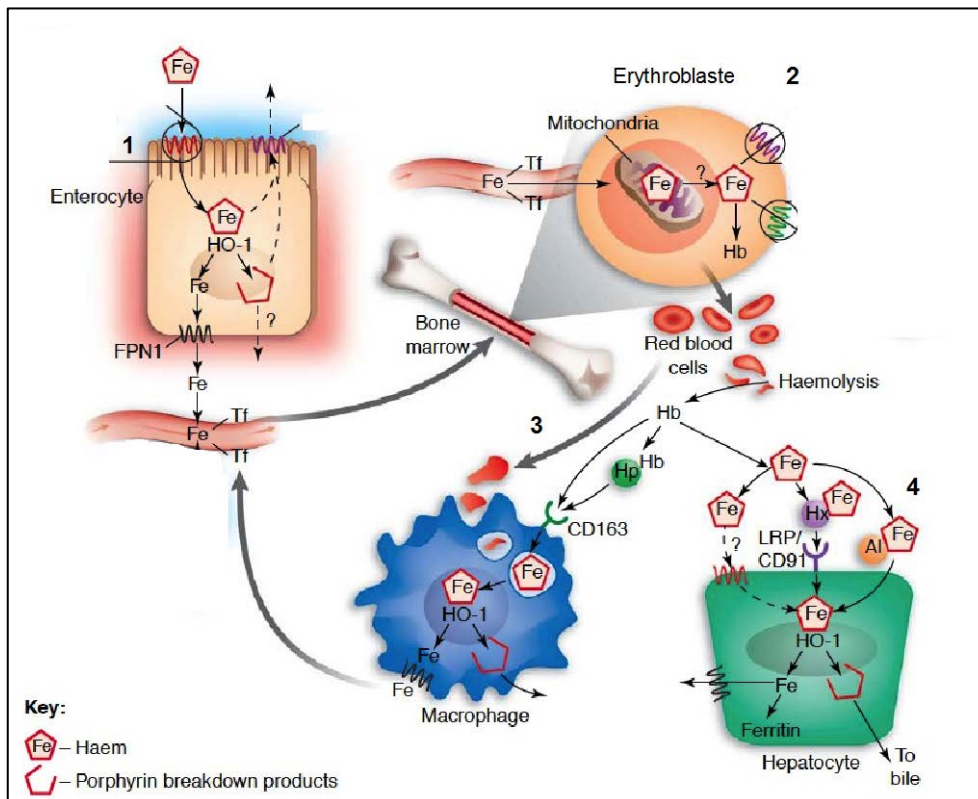
Cette oxydation se fait par l'action d'une ferroxidase, qui dans les entérocytes, est réalisée par l'héphaestine et permet à la transferrine de lier deux ions ferriques pour les délivrer à la périphérie **(1. Figure 7)**.

Une fois dans le plasma, le fer peut être utilisé par les muscles pour former la myoglobine ou par les érythroblastes de la moelle osseuse ou être stocké dans le foie et les macrophages. 70% du fer plasmatique vont être captés par les récepteurs de la transferrine (TfR1) des érythroblastes. Une fois dans ces érythroblastes, le fer va être libéré de la transferrine, puis subir une réduction en fer ferreux. Ce fer cytosolique entre dans la mitochondrie où il est utilisé pour synthétiser l'hème qui sera ajouté à la chaîne de globine pour former l'hémoglobine. **(2. Figure 7)**.

Lorsque les érythroblastes deviennent sénescents, les macrophages vont permettre, grâce à HO-1 et à la céruloplasmine (CP), de récupérer la molécule de fer et de la stocker avant de pouvoir réutiliser ce fer dans une nouvelle molécule d'hémoglobine **(3. Figure 7)**.

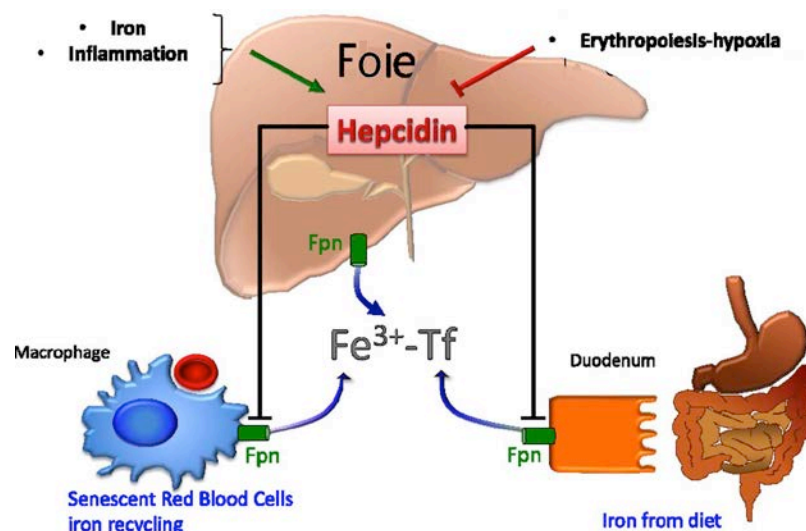
En plus de son rôle de stockage, le foie *via* les hépatocytes va réguler l'utilisation du fer périphérique par la production et la sécrétion de l'hepcidine. Les hépatocytes sont également en mesure d'évaluer la saturation de la transferrine par TfR1 et le récepteur de la transferrine 2 (TfR2) dans un processus modulé par le produit du gène de l'hémochromatose (HFE) **(4. Figure 7)**.

Sous des niveaux élevés de saturation de la transferrine, les hépatocytes augmentent la synthèse et la libération de l'hepcidine. Cette hormone va se lier à la ferroportine dans les cellules exportatrices de fer et déclencher sa dégradation qui à pour conséquence de réduire l'exportation du fer des entérocytes vers le plasma. A l'inverse, lorsque la saturation en fer de la transferrine est faible, la sécrétion d'hepcidine est réduite, ce qui permet de transporter le fer à travers la ferroportine **(Figure 8)**.



**Figure 7 : Métabolisme du fer périphérique. 1. Dans les entérocytes. 2. Dans les érythrocytes. 3. Dans les macrophages. 4. Dans les hépatocytes.**

Abréviations : Fer ferrique; FPN1: Ferroportine-1 ; HO-1: Hème Oxygénase-1 Tf: Transferrine



**Figure 8 : Régulation de l'absorption du fer par l'hepcidine.**

Abréviation : Fe<sup>3+</sup>: Fer ferrique; FPN : Ferroportine ; Tf: Transferrine

### 3. Homéostasie du fer cérébral

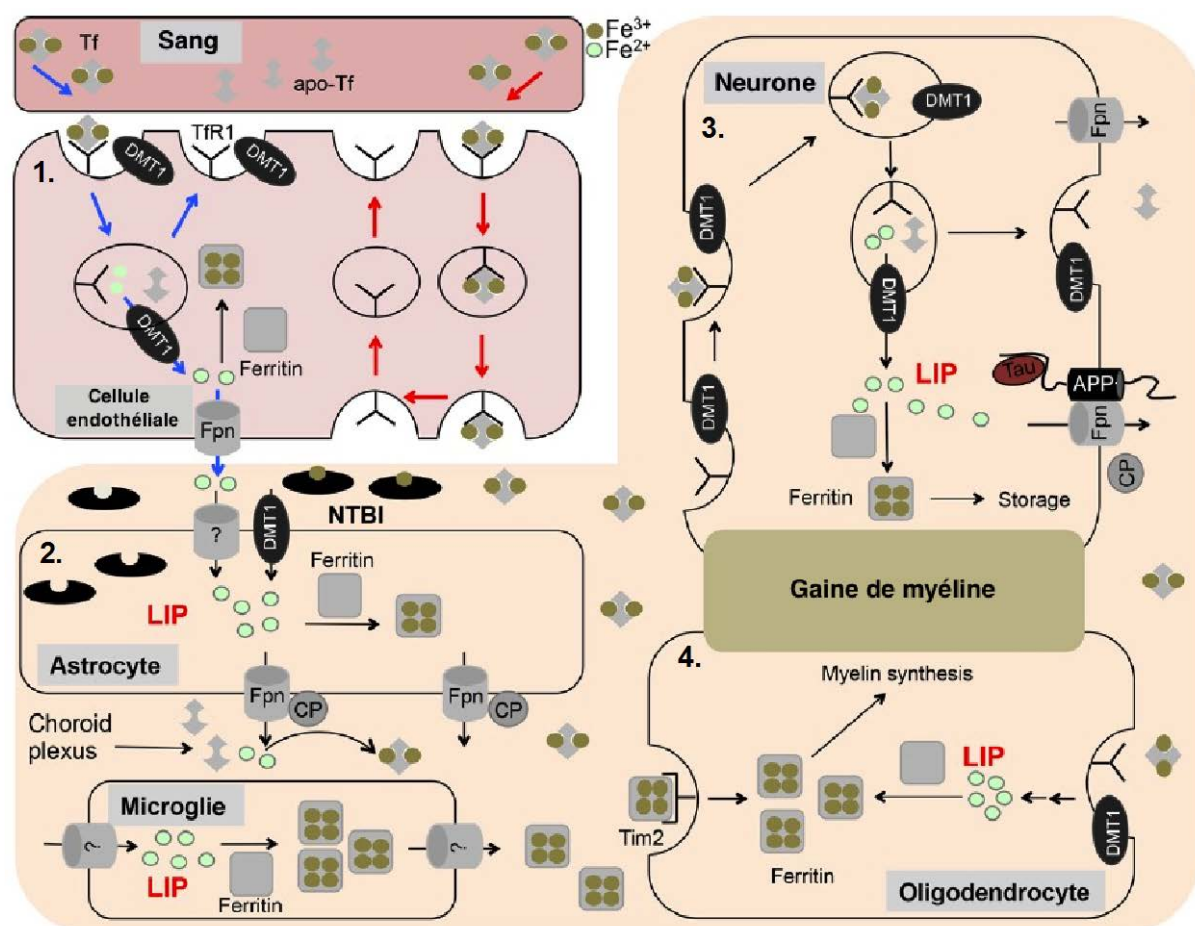
La distribution du fer dans le cerveau est hétérogène et les concentrations les plus élevées se trouvent dans la substance noire *pars compacta* (SNpc) et les ganglions de la base, qui atteignent des niveaux comparables à ceux du foie (Aquino et al., 2009; Péran et al., 2009)

La première étape de l'absorption du fer dans le cerveau intervient au niveau des cellules endothéliales de la BHE par TfR1 fortement présent dans ces cellules. En revanche, la libération du fer dans le cerveau est encore débattue et deux hypothèses ont été proposées selon la présence ou non de DMT1 dans les cellules endothéliales. Le modèle de transcytose, qui est basé sur l'absence de DMT1 propose que le fer lié à la transferrine soit transporté dans le cytosol des cellules endothéliales par les endosomes puis est directement libéré dans le cerveau (Moos et al., 2007).

Le modèle d'endocytose propose, quant à lui, que dans l'endosome, le pH acide libère le fer de la transferrine puis dans le cytosol via DMT1 avant d'être exporté dans le tissu interstitiel du cerveau à travers la ferroportine (Simpson et al., 2015) **(1. Figure 9)**.

Une fois dans le cerveau, le fer peut être capté par les astrocytes, les neurones ou les oligodendrocytes. Le fer va entrer dans les astrocytes grâce à DMT1 et un récepteur encore inconnu à ce jour car il ne possède pas de récepteur à la transferrine **(2. Figure 9)**. Dans les neurones, ce fer est capté sous forme  $Fe^{2+}$  par DMT1 et le récepteur à la transferrine va faire entrer le fer ferrique. Une fois dans ces cellules, le fer va pouvoir être stocké dans la ferritine ou être exporté par la ferroportine (Wong et al., 2014) **(3. Figure 9)**. Enfin, le fer peut également être capté par les oligodendrocytes par un récepteur qui lui est propre (Tim2). Les oligodendrocytes ont besoin du fer pour la synthèse de la myéline et la formation de la gaine de myéline (Todorich et al., 2011) **(4. Figure 9)**.

Dans le cas particulier des neurones dopaminergiques, le fer peut également être stocké dans la neuromélanine que l'on retrouve en abondance dans la substance noire.



**Figure 9 : Transport du fer cérébral. 1. Dans les cellules endothéliales. 2. Dans les astrocytes. 3. Dans les neurones. 4. Dans les oligodendrocytes. (D'après Belaidi and Bush, 2015).**

Abréviations : CP : céruloplasmine ; DMT1 : Divalent Metal Transporter 1 ; Fpn : ferroportine ; LIP : Pool de fer labile ; Tf : transferrine ; TfR1 : récepteurs de la transferrine

### A. Les différents pools de fer intracellulaire

Le fer libéré dans la cellule se répartit en 3 pools :

Le pool fonctionnel comprend le fer extra-mitochondrial incorporé dans diverses enzymes ferrodépendantes et le fer mitochondrial, qui participe à la formation de l'hème et donc à la synthèse de protéines héminiques telles que l'hémoglobine et les cytochromes (Hentze et al., 2004). Le métabolisme du fer dans la mitochondrie n'est que très partiellement connu. Deux protéines, étudiées principalement chez la levure, paraissent essentielles : la frataxine, qui jouerait un rôle dans la séquestration et la biodisponibilité du fer mitochondrial non incorporé à l'hème et l'ABC7 (*ATP Binding Cassette 7*) qui permettrait le transport de l'hème à l'extérieur de la mitochondrie (Richardson et al., 2010).

Le pool de stockage correspond à la ferritine. L'apoferritine, constituée de 24 sous-unités de 2 types, H (*heavy*) et L (*light*) assemblées en proportion variable, forme une coque protéique pouvant renfermer 4 500 atomes de fer sous forme de cristaux de phosphate d'oxyhydroxyde ferrique.

Les sous-unités H et L codées par des gènes distincts ont des fonctions différentes : H oxyde  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$  et permet son entrée dans la molécule ; L facilite la formation des cristaux. Ce fer stocké est mobilisable et réutilisable. Ainsi, la ferritine permet la séquestration d'un fer potentiellement toxique et constitue une réserve accessible (Theil, 2004).

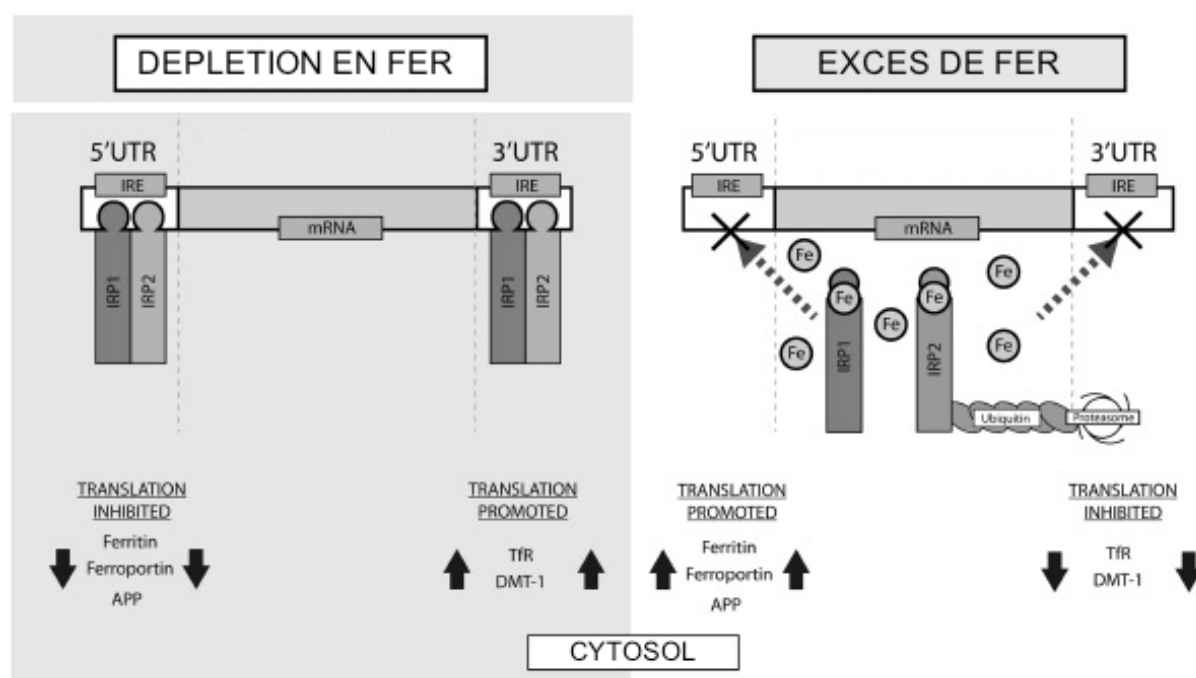
Enfin, le dernier pool constitue le pool de fer labile intracytoplasmique, également appelé pool de transit, composé de fer "libre". Bien que ce pool ne représente que 1% du fer intracellulaire, il joue un rôle essentiel dans son métabolisme. Il représente une interface entre le fer extracellulaire et les deux autres pools et il régule l'entrée et le stockage du fer dans la cellule. Mais il est aussi potentiellement toxique puisque sous forme libre. Il est généralement admis qu'une hausse importante et persistante du pool de fer labile peut compromettre l'intégrité des cellules par le biais des interactions entre le fer et les espèces réactives de l'oxygène. Ainsi c'est le fer de ce pool qui va participer à la réaction de Fenton, à la réaction d'Haber-Weiss ou qui va engendrer la 6-OHDA induisant et augmentant le stress oxydant au sein de la cellule (Cabantchik, 2014).

## **B. Régulation par les éléments de réponse au fer (IRE)**

Une régulation précise de ce pool apparaît donc essentielle. En fonction des besoins et du fer disponible à l'intérieur de la cellule, le fer est réparti à partir de ce compartiment dans le pool fonctionnel ou dans le pool de stockage. Des mécanismes de régulation permettent à la cellule d'adapter ses capacités d'acquisition et de stockage du fer à ses besoins. Lorsque les besoins augmentent, il s'avère que la cellule favorise la captation du fer extracellulaire, mobilise ses réserves intracellulaires et augmente ainsi son pool fonctionnel. À l'inverse, lorsque les besoins diminuent, elle ralentit la captation de fer extracellulaire et stocke le fer non utilisé.

Les cellules utilisent deux protéines régulatrices du fer (IRP 1 et 2) en tant que capteur du pool de fer labile cytosolique qui vont se lier aux éléments de réponse au fer (IRE). Ces IRE sont situés dans des structures tige-boucle au sein de la région non traduite (UTR) de l'ARNm des acteurs impliqués dans le transport et le stockage du fer. Si la liaison se fait dans la partie 3'UTR, l'ARNm est stabilisé et l'expression est augmentée. À l'inverse, si la liaison se fait dans la région 5'UTR l'expression du messageur est diminuée.

En conséquence, ce système de régulation du fer augmente la liaison des IRP aux IRE dans des conditions de faible teneur en fer cellulaire et conduit à augmenter l'absorption du fer par TfR1 et DMT1, tandis que le stockage du fer par la ferritine et l'exportation de fer par ferroportine sont réduits. A l'inverse, lorsque les niveaux de fer cellulaires sont élevés, le fer labile se lie à l'IRP et empêche leur interaction avec les IRE, ce qui entraîne une augmentation du stockage et de l'exportation de fer grâce à la traduction des ARNm de la ferroportine et de la ferritine, alors que l'absorption du fer est réduite par la dégradation de l'ARNm de TfR1 et de DMT1 (Hare et al., 2013; Muckenthaler et al., 2008; Wong and Duce, 2014) (**Figure 10**).



**Figure 10 : Régulation du fer intracellulaire par les IRE et les IRP (D'après Hare et al., 2013)**

Le métabolisme du fer est également régulé transcriptionnellement par l'action des facteurs induits par l'hypoxie (HIF) qui consiste en une protéine cytosolique (HIF-1 $\alpha$ ) et une sous-unité HIF-1 $\beta$  nucléaire qui forment un hétérodimère lié à l'ADN.

Les niveaux de HIF-1 $\alpha$  sont dictés par la chimie cellulaire et dans des conditions de normoxie, HIF-1 $\alpha$  est hydroxylé par la prolyl-hydroxylase (PHD) qui induit une activité d'ubiquitination, ce qui mène à la dégradation de cette sous-unité alpha par le protéasome cytoplasmique. Cette réaction nécessite de l'oxygène, du 2-oxoglutarate, de l'ascorbate, et le fer comme cofacteurs.



En situation d'hypoxie, la sous-unité alpha devient stable, car elle n'est plus hydroxylée par les PHD, son substrat étant l'oxygène. L'ubiquitination de HIF-1 $\alpha$  est alors inhibée. La sous-unité est alors transportée dans le noyau par translocation nucléaire où elle se liera à la sous-unité bêta ainsi qu'à certains cofacteurs. Le complexe HIF-1 ainsi formé permettra la transcription des gènes cibles possédant un élément de réponse à l'hypoxie (HRE ; Semenza, 2000).

Comme le fer est nécessaire pour hydroxylation de HIF-1 $\alpha$ , toute diminution des niveaux de fer cellulaire augmentera la dimérisation de HIF-1 $\alpha$  et  $\beta$  et la transcription en aval des gènes cibles, qui comprend les gènes de la transferrine, (Rolfs et al., 1997), TfR1 (Lok and Ponka, 1999) et DMT1 (Lis et al., 2005).

## **4. Le rôle du fer dans la maladie de Parkinson**

### **A. Altération de l'homéostasie du fer dans la maladie de Parkinson**

Le vieillissement normal est accompagné d'une accumulation progressive du fer dans certaines régions du cerveau. De nombreuses études ont mises en évidence une augmentation de fer dans des régions telles que le locus niger, le putamen, le globus pallidus, le noyau caudé et les noyaux corticaux. Toutes ces régions sont associées à des troubles neurodégénératifs (Hare et al., 2013; Ward et al., 2015).

Cependant, une question majeure n'a pas encore été élucidée à savoir si l'accumulation excessive de fer dans ces régions est un événement initial qui provoque une neurodégénérescence ou si cette accumulation est une conséquence de la maladie.

Dans le cas de la maladie de Parkinson, dès la fin des années 80, une accumulation de fer a été observée dans la SN des patients parkinsoniens. Cette accumulation est même corrélée avec la sévérité de la maladie (Hirsch et al., 1991). Ce dysfonctionnement de l'homéostasie dans les neurones et dans les astrocytes de la SN est dû au changement d'expression des protéines de régulation du fer intracellulaire. Il a été montré que DMT1 est élevé dans la SN des patients parkinsoniens augmentant l'importation du fer dans les cellules (Salazar et al., 2008). L'exportation du fer est également modifiée et il a été observé une diminution de la ferroportine et une diminution de l'activité de la CP (Ayton et al., 2013; Song et al., 2010). Enfin, les niveaux de neuromélanines sont diminués dans les cerveaux de patients parkinsoniens et bien que les observations sur les niveaux de ferritine soient controversées, on observe des dérèglements de l'expression de la ferritine chez ces patients (Dexter et al., 1990; Faucheux et al., 2002; Zecca et al., 2002)

## **B. Le rôle du fer sur les facteurs de susceptibilités des neurones dopaminergiques**

La perte de capacité de stockage du fer tend à augmenter le pool de fer labile « libre » dans la cellule. Riederer et al. ont rapporté que  $\text{Fe}^{3+}$  était significativement augmenté dans la SN de patients alors que le  $\text{Fe}^{2+}$  demeure inchangé (Riederer et al., 1989).

En plus d'entrer dans la réaction de Fenton, ce fer libre va interagir avec tous les facteurs de susceptibilité des neurones dopaminergiques et va augmenter le stress oxydant.

Hare et al., ont observé une colocalisation très précise entre le fer et la dopamine dans la SNpc d'un modèle murin de la maladie de Parkinson expliquant la vulnérabilité de cette région (Hare et al., 2014). De plus, le fer, avec  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en présence de dopamine peut induire la formation de la 6-OHDA neurotoxique (Linert et al., 1996).

De par son rôle de stockage du fer, la neuromélanine peut avoir un rôle dans la pathogénèse de la maladie. Lors de la dégénérescence, la destruction des neurones dopaminergiques induit la dégradation de la neuromélanine libérant le fer qu'elle contient dans la cellule, ce fer pouvant à nouveau augmenter le stress oxydant (Zucca et al., 2014).

Le Fer peut également réagir avec des hydroperoxydes lipidiques pour générer un radical alcoxy qui peut à son tour réagir avec des acides gras polyinsaturés, le substrat pour la peroxydation lipidique. Ainsi l'augmentation de fer intracellulaire dans la cellule engendre une peroxydation lipidique perpétuelle qui va augmenter le stress oxydant subit par la cellule (Montine et al., 2004).

Enfin, le fer peut réagir avec l'alpha-synucléine, des études *in vitro* ont montré que le fer induit un changement conformationnel de l'alpha-synucléine, de l'hélice-alpha en feuillet-beta formant des fibrilles qui sont présents dans les corps de Lewy (Uversky et al., 2001a). De plus, il a été démontré que le fer pouvait s'accumuler dans les corps de Lewy de la SN des patients parkinsoniens (Castellani et al., 2000).

## **5. La chélation du fer comme approche thérapeutique dans la maladie de Parkinson**

L'abondance de fer dans les régions affectées par la maladie de Parkinson a rendu pertinente l'utilisation de chélateurs de fer comme approche thérapeutique dans cette pathologie. De nombreuses études expérimentales ont prouvé l'efficacité des chélateurs de fer.

La déféroxamine a été le premier chélateur testé par Ben-Shachar et *al.*, ils ont montré une réduction de la dégénérescence liée à la 6-OHDA et une amélioration des réponses comportementales notamment sur l'activité locomotrice spontanée (Ben-Shachar et *al.*, 1991). Ces premiers travaux ont ouvert la porte à de nombreuses études mais les difficultés dans l'utilisation de chélateur du fer sont en grandes parties causées par l'incapacité des grandes molécules telles que la déféroxamine à traverser la BHE ce qui est une condition préalable pour éliminer le fer du cerveau. Par conséquent, plusieurs composés de faible masse moléculaire ayant des affinités variables pour le fer ont été développés. Ainsi en 2003, Kaur et *al.*, montrent que le clioquinol diminue les niveaux de fer et empêche la toxicité du MPTP dans un modèle de souris (Kaur et *al.*, 2003). Puis, le VK28 (Shachar et *al.*, 2004), le deferasirox et la déféripone (Dexter et *al.*, 2011) ont tous montré des effets bénéfiques sur la dégénérescence des neurones dopaminergiques chez le rat 6-OHDA ou la souris MPTP.

Au cours des dernières années, Youdim et ses collègues ont mis au point une série de chélateurs du fer « multifonctionnels », tels que M30, HLA20 et VAR. Dans une étude récente menée par Bar-Am et *al.* VAR, est capable de chélater le fer et d'atténuer le stress oxydatif induit par la peroxydation des lipides, d'améliorer les symptômes moteurs des rat 6-OHDA et des souris MPTP mais il est également capable d'inhiber l'activité de la MAO-A et de la MAO-B et ainsi d'augmenter les niveaux de dopamine et de sérotonine (Bar-Am et *al.*, 2015; Youdim et *al.*, 2006). Comme les patients parkinsoniens ont souvent des syndromes dépressifs associés aux symptômes moteurs (Goetz, 2010), VAR constitue un chélateur prometteur qui peut ralentir la progression de la maladie, améliorer les symptômes moteurs, et soulager la dépression dans la MP.

Un autre chélateur, le M30 a la capacité de chélater le fer, en régulant le facteur inductible par l'hypoxie (HIF)-1 $\alpha$  et ses protéines en aval, telles que le facteur de croissance endothélial vasculaire, l'érythropoïétine (EPO) et l'énolase-1 ce qui induit l'expression d'une série de facteurs neurotrophiques comme le BDNF et le GDNF et des enzymes antioxydantes, notamment la catalase, la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase (Kupersmidt et *al.*, 2011).

Enfin des molécules naturelles, la plupart issues du thé vert comme la gallate d'épigallocatechine (EGCG) ou la catéchine ont été testées dans des études précliniques mais leurs effets sont beaucoup plus modérés dans les modèles murins de la maladie de Parkinson (Leaver et *al.*, 2009; Levites et *al.*, 2001; Lu et *al.*, 2003).

Sur le plan clinique, le chélateur de fer devrait essentiellement être capable de pénétrer les membranes cellulaires ainsi que la barrière hémato-encéphalique, cibler la région d'accumulation de fer sans épuiser le fer plasmatique et être en mesure de retirer le

fer chélaté à partir du site d'accumulation ou à le transférer à d'autres protéines biologiques telles que la transferrine circulant. Etant donné que la défériprone soit un médicament déjà présent sur le marché pour le traitement de la thalassémie, et ajouté à cela le fait que se soit une molécule oralement active passant la BHE, en ont fait le candidat idéal pour tester un chélateur de fer dans un essai clinique chez l'Homme.

En 2012, Kwiatkowski *et al.* ont étudié l'efficacité de la défériprone chez un seul patient atteint d'une neurodégénérescence avec accumulation de fer (NBIA) qui montrait des taux élevés de fer dans les noyaux dentelés bilatéraux, la SN et les noyaux rouges. Le traitement à long terme du patient par défériprone a montré une diminution rapide du fer dans le noyau dentelé bilatéral et une diminution plus douce et progressive dans la SN. Après 1 an de traitement, ils ont observé une amélioration de 30% de l'état du patient mesuré par l'UPDRS conduisant à une amélioration de 25% dans ses activités de la vie quotidienne. Surtout la chélation n'a montré aucun effet secondaire apparent neurologiques ou hématologiques (Kwiatkowski *et al.*, 2012). Très récemment, notre équipe a mis en place le premier essai clinique d'un chélateur de fer dans la maladie de Parkinson. Cet essai clinique a été réalisé chez des patients parkinsoniens à un stade précoce de la maladie. Les patients traités par la défériprone étaient comparés à un groupe de patients sous placebo. Les résultats ont révélé que les patients ayant reçu la défériprone ont montré une diminution progressive du handicap moteur mesurée par l'UPDRS, et une diminution des dépôts de fer dans le SN mesurée par IRM (Devos *et al.*, 2014a). Ainsi, la défériprone pourrait être le premier traitement modificateur de la maladie de Parkinson. De plus, une autre étude de notre laboratoire a montré que l'activité de la CP pourrait jouer un rôle dans le mécanisme thérapeutique de la défériprone, les patients parkinsoniens possédant une plus faible activité de la CP répondent mieux à la thérapie de chélation du fer (Grolez *et al.*, 2015).

Comme nous l'avons vu, le fer « libre » nécessite une régulation précise de son homéostasie, dans le cas contraire, il peut augmenter le stress oxydant et induire la mort cellulaire.

## IV. La mort neuronale dans la maladie de Parkinson

Le stress oxydant associé aux facteurs de susceptibilités augmentant ce stress oxydant va conduire *in fine* à la mort des neurones dopaminergiques.

### 1. Mort neuronale

#### A. Généralités

La mort cellulaire est un processus essentiel à l'homéostasie des tissus de l'organisme car elle permet d'éliminer les cellules surnuméraires lors du développement, les cellules dysfonctionnelles, les cellules ectopiques ou encore les cellules infectées par un virus ou une bactérie (Levine et al., 1993). De nombreuses classifications existent en ce qui concerne les voies de mort cellulaire. Elles peuvent être classées selon des critères enzymologiques (implication des caspases ou non), morphologiques ou par des aspects fonctionnels (physiologiques versus pathologiques, programmées versus accidentelles) (Galluzzi et al., 2012). L'activation inappropriée de la mort cellulaire est impliquée dans de nombreuses pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Su et al., 1994) ou la maladie de Parkinson (Mochizuki et al., 1996).

Pendant de nombreuses années, la classification morphologique permettait de distinguer trois types de mort cellulaire, l'apoptose (type I), l'autophagie (type II) et la nécrose (type III). Les deux premiers types de mort sont considérés comme des morts cellulaires programmées alors que la nécrose est considérée comme la mort cellulaire accidentelle, cependant de récentes découvertes génétiques ainsi que la découverte d'un inhibiteur chimique de la nécrose ont changé ce point de vue et ont révélé l'existence de multiples nécroses régulées.

#### B. Apoptose

L'apoptose est un processus essentiel au développement et au maintien de nombreux tissus. Il s'agit d'un mécanisme de défense consécutif à des réactions immunes et qui intervient lorsque les cellules sont endommagées. L'apoptose est caractérisé par des critères morphologiques, moléculaires et biochimiques comme une condensation de la chromatine, une fragmentation nucléaire, le rétrécissement du cytoplasme et la formation de corps apoptotiques (Kerr et al., 1972). Dans la plupart des cas, l'apoptose est associée à l'activation des caspases et à la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Marzo et al., 1998).

Bien que les caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose soient similaires et conservées au cours de l'évolution des espèces, le signal initial de l'induction de l'apoptose peut varier. L'apoptose peut être déclenchée par de nombreux facteurs, dont des signaux intracellulaires positifs ou négatifs, une diminution des facteurs de croissance, des médicaments anti-tumoraux ou encore des dommages à l'ADN par les ROS. L'apoptose peut être induite par deux voies d'activation : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. Chaque stimulus active l'apoptose par sa propre voie spécifique mais ces deux voies convergent vers deux éléments hautement conservés et centraux dans l'apoptose, les caspases et la famille de protéines Bcl-2 (Kannan and Jain, 2000).

### *i. La voie apoptotique extrinsèque*

La voie extrinsèque de l'apoptose, qui a un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, est induite par la liaison d'un ligand extracellulaire sur son récepteur transmembranaire qui va propager un signal létal dans la cellule. Ces ligands sont Fas-L, le TNF- $\alpha$  et TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*). Dans l'exemple de Fas-L, sa liaison avec son récepteur FasR entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice FADD (*FAD associated protein with a Death Domain*).

FADD va ensuite s'associer à la procaspase-8, formant ainsi un complexe de signalisation de mort cellulaire appelé DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) qui conduit à l'auto-activation de la pro-caspase-8. A son tour, la pro-caspase-8 conduit à l'activation de caspase-3, caspase-6 et la caspase-7 ou à la perméabilisation de la mitochondrie en clivant la molécule BID, provoquant ainsi le relargage du cytochrome C (**figure 11**).

### *ii. La voie apoptotique intrinsèque*

La voie intrinsèque est également connue comme étant la voie mitochondriale de l'apoptose. Cette voie est activée par le stress cellulaire, comme la privation de facteur de croissance, une rupture du cytosquelette, des lésions de l'ADN, l'accumulation de protéines dépliées, l'hypoxie, et bien d'autres (Brenner and Mak, 2009). Elle est sous le contrôle des protéines membres de la famille Bcl-2 incluant les inducteurs de l'apoptose (par exemple, Bax, Bak, Bid, Bad) et les inhibiteurs de l'apoptose (par exemple, Bcl-2, Bcl-XL). À ce jour, 25 membres de la famille Bcl-2 ont été identifiés: ces molécules sont structurellement différentes et contrôlent l'intégrité mitochondriale, en particulier la perméabilité de la membrane externe.

En réponse à de multiples conditions de stress intracellulaire, des signaux de survie ou de mort convergent vers la mitochondrie. Quand les signaux de mort prévalent, Bax et Bak, pro-apoptotiques, forment un complexe moléculaire dans les membranes mitochondriales et induisent sa perméabilisation (*MOMP : mitochondrial outer membrane permeabilization*). Cette perméabilisation va conduire au relargage de protéines intramembranaires dont le cytochrome C dans le cytosol. Celui-ci déclenche l'activation de la caspase 9 en formant un complexe protéique appelé apoptosome qui est constitué de la pro-caspase-9, de la molécule APAF-1 et de molécules d'ATP. Ce complexe va ensuite déclencher l'activation d'autres caspases jusqu'à la caspase-3 (**Figure 11**).

Enfin, la perméabilisation de la membrane mitochondriale permet aussi l'exécution du mécanisme d'apoptose indépendante des caspases. La molécule AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) et l'endonucléase G sortant de la mitochondrie peuvent être adressées au noyau et fragmenter l'ADN.

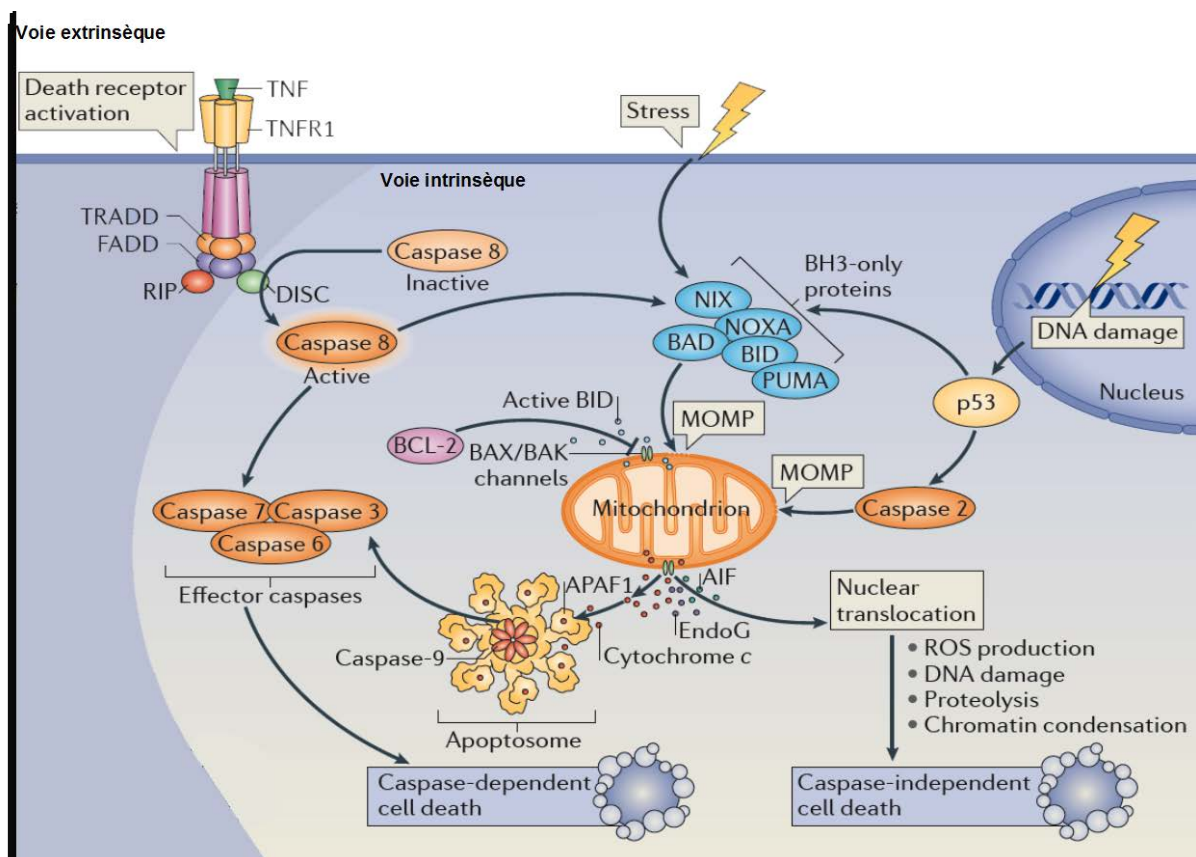


Figure 11 : Voie extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose (D'après Mariño et al., 2014)

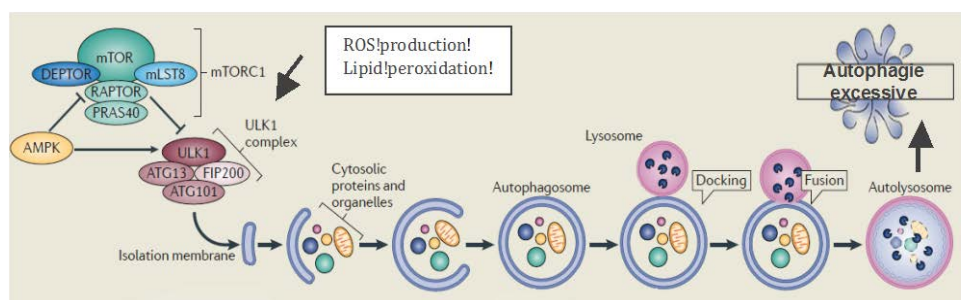
### C. Autophagie

L'autophagie est un processus vital de dégradation qui confère aux cellules une résistance au stress ou à la privation de nutriments par le recyclage de ses propres constituants (acides aminés, acides gras, sucres) qui peuvent alors être réutilisés par la cellule pour la néosynthèse de protéines et l'apport en énergie (Maiuri et al., 2007). La cellule déclenche ce processus pour survivre à des périodes de jeûne, pour éliminer des composants intracellulaires altérés ou des pathogènes (Levine and Klionsky, 2004).

Dans des conditions physiologiques, en absence d'agression, l'autophagie basale assure le maintien de l'homéostasie cellulaire en régulant le recyclage des protéines, lipides et organites, notamment dans les neurones où elle module la plasticité synaptique en régulant le trafic et la dégradation des récepteurs et protéines synaptiques (Boland and Nixon, 2006).

L'induction de l'autophagie est contrôlée par la protéine mTOR (*mammalian target of rapamycin*), une protéine sérine/thréonine kinase inhibitrice de l'autophagie. L'inhibition de mTOR par des acides aminés, la phosphoinositide 3-kinase de type I (PI3K), eIF2a et Ras ou la rapamycine entraîne l'initiation de l'autophagie. Chez les mammifères, l'initiation de l'autophagie entraîne l'activation de ULK1 (Atg1) qui forme un complexe avec FIP200 (Atg17) et Atg13. C'est ce complexe qui va recruter ensuite d'autres protéines et permet l'initiation de la formation de l'autophagosome par séquestration d'une partie du cytoplasme (Xie and Klionsky, 2007). L'autophagosome va ensuite fusionner avec les lysosomes pour former des autophagolysosomes également nommés autolysosomes (**Figure 12**).

L'autophagie est activée dans de nombreuses pathologies qui mènent à la dégénérescence cellulaire, notamment dans le cerveau, les muscles, le foie ou le cœur. Bien qu'elle ait longtemps été considérée comme le mécanisme de mort cellulaire programmée non-apoptotique de type II, il apparaît aujourd'hui que l'autophagie soit induite dans de nombreuses pathologies afin de protéger la cellule. C'est plutôt la dérégulation du flux autophagique qui va conduire à la mort cellulaire par apoptose (Levine and Kroemer, 2008).



**Figure 12 : Processus de formation des autolysosomes dans l'autophagie (Mariño et al., 2014)**



## D. Nécrose et nécrose régulée

### *i. Nécrose*

La nécrose a longtemps été considérée comme un mécanisme de mort accidentelle morphologiquement différent de l'apoptose et de l'autophagie. La nécrose est souvent la conséquence de stress physiologiques et de lésions aiguës. Elle est caractérisée par une déplétion en ATP incompatible avec la survie des cellules. Ce processus est accompagné par la dilatation et le démantèlement des organites, en particulier de la mitochondrie. Elle se caractérise également par l'augmentation du volume cellulaire conduisant à la rupture précoce de la membrane plasmique qui induit une libération du contenu cellulaire et de molécules pro-inflammatoires (Edinger and Thompson, 2004).

### *ii. Nécrose régulée*

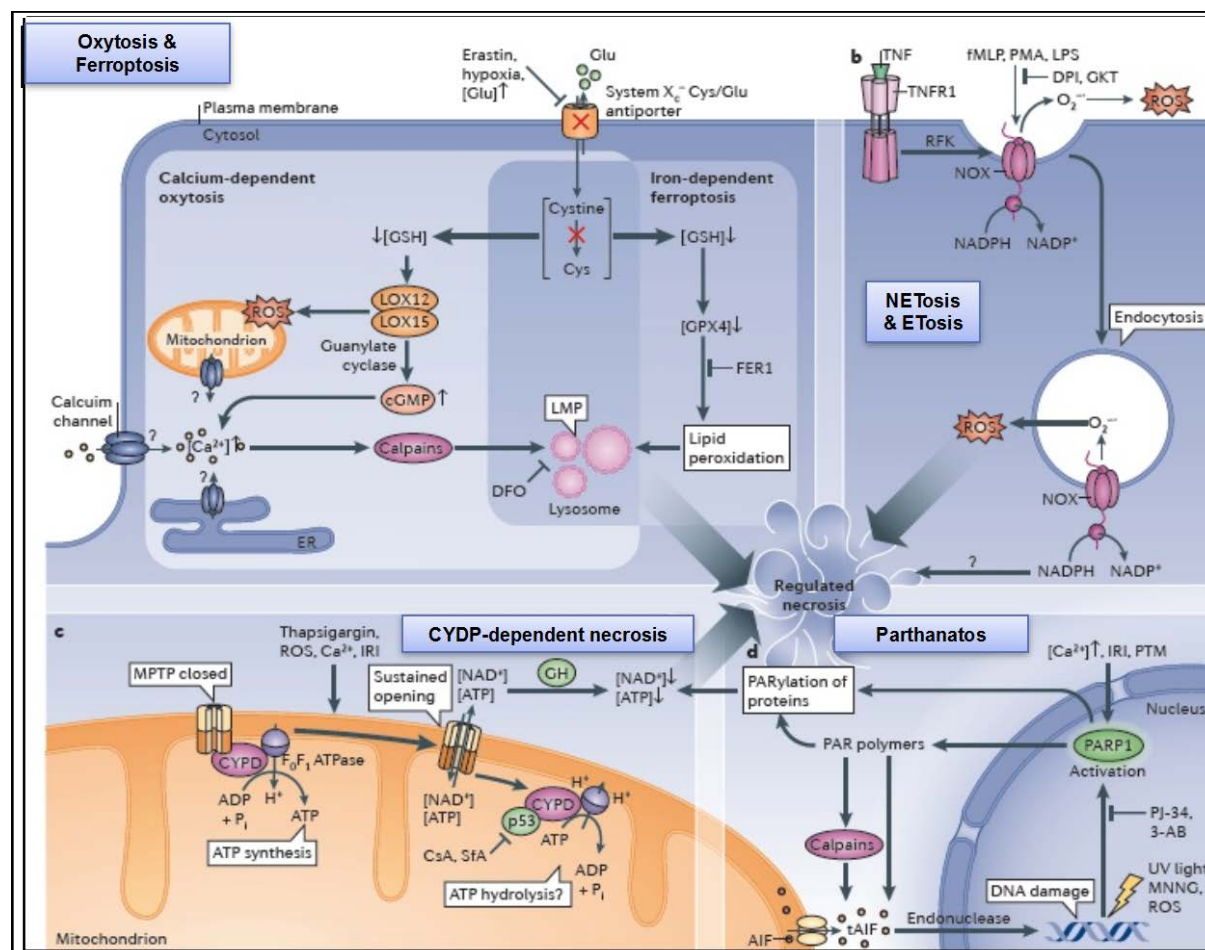
A la fin des années 80, la découverte que le  $\text{TNF}\alpha$  était capable de tuer des cellules cancéreuses par un phénotype apoptotique ou nécrotique a permis d'émettre l'hypothèse d'une possible régulation de la nécrose. Cette hypothèse a continué à prendre de l'ampleur dans les années 1990 (Grooten et al., 1993; Holler et al., 2000; Vercammen et al., 1998) et a été définitivement confirmée en 2005, lorsque l'équipe de Junying Yuan a découvert un groupe de molécules qui inhibent la mort cellulaire nécrotique : les nécrostatines (Degterev et al., 2005). Les auteurs vont qualifier cette mort par le terme nécroptose qui va devenir la première nécrose régulée. Depuis cette découverte, de nombreuses études ont, dans un premier temps, permis de caractériser de façon précise la voie de signalisation de cette mort cellulaire.

La nécroptose a été observée dans des modèles animaux de plusieurs pathologies notamment les lésions ischémiques et les infections virales (Cho et al., 2009; Degterev et al., 2005).

Puis, de nombreuses études ont mis en évidence d'autres formes de nécroses régulées et les tentatives pour définir et classer ces formes de mort cellulaires ont donné lieu à de multiples néologismes, comme « necroptosis », « parthanatos », « oxytosis », « pyroptosis », « ETosis », « NETosis », « pyronecrosis » et « ferroptosis ».

Toutes ces formes de mort cellulaire possèdent leurs propres mécanismes mais un déroulement commun : un déclencheur actionne un mécanisme d'initiation qui active ensuite plusieurs médiateurs qui propagent le signal. Enfin, ce signal va activer des effecteurs qui par des mécanismes biochimiques différents causent la mort cellulaire (**Figure 13**).

L'exemple de la nécroptose montre que la nécrose programmée peut être plus importante qu'on ne le pensait dans la mort cellulaire pathologique. De plus, cela montre qu'une meilleure compréhension des voies de signalisation de ces différents types de mort cellulaire pourrait ouvrir des applications thérapeutiques dans diverses pathologies.



**Figure 13 : Mécanismes d'action des différentes nécroses régularisées (Adapté de Berghe et al., 2014).**

### E. Mort neuronale dans la maladie de Parkinson

Bien que la participation de l'apoptose dans la perte neuronale dopaminergique de la MP soit controversée (Wüllner et al., 1999), plusieurs études *post-mortem* ont identifié des caractéristiques de l'apoptose dans le cerveau de patients parkinsoniens. La fragmentation de l'ADN, la condensation de la chromatine, les changements morphologiques et la phagocytose de corps apoptotiques ont été observées dans les neurones dopaminergiques de ces patients (Anglade et al., 1997). Dans une variété de modèles cellulaires et animaux de la MP, une augmentation de Bax a été observée, il est ensuite transloqué dans la mitochondrie et est nécessaire pour l'exécution de l'apoptose (Perier et al., 2007).

Les marqueurs physiopathologiques peuvent également être impliqués dans la régulation de l'apoptose. Par exemple, une surexpression de l'alpha-synucléine sauvage ou mutée dans des PC12 provoque une augmentation de la sensibilité à l'apoptose probablement par un gain toxique de fonction (Tanaka et al., 2001). De plus, de nombreuses données suggèrent que l'agrégation d'alpha-synucléine observée dans la MP est capable de promouvoir la mort cellulaire (Uversky, 2007). Enfin, la plupart des gènes associés à des formes familiales de MP, comme parkin (Müftüoglu et al., 2004), PINK1 (Silvestri et al., 2005), DJ-1 (Thomas and Beal, 2007), et HTRA2 (Strauss et al., 2005), sont impliqués dans la régulation de l'apoptose. Des mutations dans ces gènes, en plus de provoquer la maladie de Parkinson, suppriment leurs propriétés protectrices et augmentent la sensibilité des neurones dopaminergiques à l'apoptose.

Dans la maladie de Parkinson, l'autophagie est altérée, ce qui entraîne une accumulation de mitochondries anormales qui ne peuvent pas être dégradées. Cette accumulation peut contribuer à la mort cellulaire par une libération accrue de facteurs pro-apoptotiques des mitochondries endommagées (Wong and Cuervo, 2010). De plus, des études ont montré que les mutations pathogènes dans PINK1 et parkin perturbent le rôle de ces protéines à promouvoir la dégradation autophagique des mitochondries dysfonctionnelles, ce qui conduit à une autophagie défectueuse (Narendra et al., 2010).

Dans les formes sporadiques, l'autophagie défectueuse peut être la conséquence d'une réduction de la quantité de lysosomes fonctionnels. Cette diminution est souvent associée à une perméabilisation anormale des lysosomes due à l'attaque des ROS (Chu et al., 2009).

## **V. La ferroptose: une nouvelle forme de mort cellulaire**

### **1. Découverte d'une nouvelle forme de mort cellulaire**

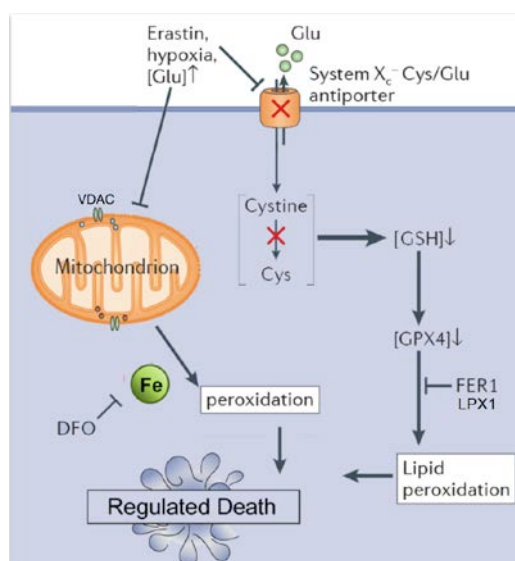
Les inducteurs de la ferroptose ont été découverts bien avant que naisse le terme ferroptose. En 2003, grâce à la technique du criblage à haut débit, Dolma *et al.* ont testé 23 550 composés pour leur capacité à tuer des cellules rendues tumorigènes par plusieurs ajouts d'oncogènes dont celui de RAS (muté dans environ 25% des cancers). Des cellules fibroblastiques humaines sont rendues tumorigéniques par l'ajout de hTERT, une sous-unité catalytique de la télomérase, les oncoprotéines *Large T* (LT) et *small T* (ST) de SV40 et onco-RAS. Grâce à leur système automatisé et leur large criblage, ils identifient 9 composés au minimum 4 fois plus actifs sur ces cellules tumorigéniques. Parmi les composés identifiés, se trouvent l'érastine qu'ils baptisent ainsi pour sa spécificité envers ces cellules (*eradicator of ras and ST cells*).

Par des études morphologiques, ils remarquent également que ce composé n'induit aucun changement morphologique au niveau du noyau, n'induit pas de fragmentation d'ADN et n'active pas les caspases concluant que ce composé, l'érastine, induit une forme de mortalité non-apoptotique (Dolma et al., 2003a).

Puis, en 2007, Yagoda *et al.* vont montrer que cette mort cellulaire est dépendante de la voie de signalisation RAS-RAF-MEK et qu'elle peut être inhibé par des antioxydants suggérant un rôle des ROS, et notamment lipidique, dans cette mort. Enfin ils montrent que l'érastine se lie au *voltage-dependent anion channels* (VDAC) et altère la perméabilité de la membrane externe des mitochondries.

En 2008, deux autres composés, RSL3 et 5 (RAS Selective Lethal) sont découverts par le criblage de 47 725 composés par Yang *et al.* RSL3 et RSL5 ont des propriétés similaires à l'érastine à savoir l'activation de la voie RAS-RAF-MEK, la liaison aux VDAC et l'implication des ROS lipidique. Les auteurs observent également que deux chélateurs de fer dont la déféroxamine (DFX) sont capables d'inhiber les effets des RSLs et de l'érastine suggérant un rôle du fer intracellulaire dans cette nouvelle forme de mort (Yang and Stockwell, 2008).

C'est en 2012 que Dixon *et al.* vont définir cette nouvelle forme de mort cellulaire comme étant une mort cellulaire non-apoptotique et vont lui donner le nom de ferroptose car elle est dépendante du fer intracellulaire et uniquement de ce métal. Ils vont également caractériser de manière très complète la ferroptose comme étant biochimiquement, morphologiquement et génétiquement distincte de l'apoptose, de la nécrose et de l'autophagie. Toujours dans leurs travaux ils vont identifier les cibles de l'érastine, l'effecteur de cette mort et vont également identifier un inhibiteur spécifique de cette mort cellulaire.



**Figure 14 : Voie moléculaire de régulation de la ferroptose (D'après Yang et Stockwell, 2015).** Abréviations : DFO: Deferroamine ; Fe: fer ; GSH : Glutathion ; GPX4 : Glutathion Peroxidase 4 ; VDAC: *Voltage Dependant Anion Channel*

## 2. La ferroptose, une mort cellulaire possédant ses propres caractéristiques.

Dixon et al. définissent la ferroptose comme une mort distincte des autres morts cellulaires car les effets de l'érastine ne sont pas contrés par un inhibiteur de l'apoptose, de l'autophagie, ou de la nécrose. De plus, la ferroptose est distincte de ces morts cellulaires connues sur le plan morphologique, biochimique, et génétique.

D'un point de vue morphologique, l'érastine n'induit pas la condensation de la chromatine que l'on retrouve dans l'apoptose, elle n'induit pas le gonflement cytoplasmique des organites et la rupture de la membrane plasmique caractéristique de la nécrose et enfin l'érastine n'induit pas la formation de vacuoles à doubles membranes que l'on retrouve dans l'autophagie (Dixon et al., 2012).

Du point de vue biochimique, la caractéristique primaire de l'apoptose est l'activation des caspases. La mort induite par l'érastine ne montre aucun signe d'activation de caspases effectrices tout comme il n'y a ni libération de cytochrome c ni clivage de PARP-1 (Yagoda et al., 2007). Enfin, l'érastine n'induit pas de déplétion en ATP caractéristique de la nécrose (Dixon et al., 2012).

Pour tenter d'identifier un réseau génétique propre à la ferroptose, Dixon *et al.* ont utilisé une bibliothèque de shRNA ciblant 1 087 gènes, tous impliqués dans des fonctions mitochondriales. Dans un premier temps, en comparant les effets de ces shRNA sur la ferroptose induite par l'érastine et sur l'apoptose induite par la staurosporine, aucune corrélation n'a été observée entre les shRNA qui ont protégé les deux morts cellulaires confirmant que les réseaux génétiques impliqués dans la ferroptose et dans l'apoptose sont différents (Dixon et al., 2012).

Grâce à ce système, les auteurs ont identifié six gènes qui sont nécessaires à la ferroptose. Ces gènes sont RPL8 (*ribosomal protein L8*), IREB2 (*iron response element binding protein 2*), ATP5G3 (*ATP synthase F0 complex subunit C3*), CS (*citrate synthase*), TTC35 (*tetratricopeptide repeat domain 35*) and ACSF2 (*acyl-CoA synthetase family member 2*). Le KO de ces gènes, confère une protection contre la ferroptose mais pas contre la mort cellulaire induite par la staurosporine, la roténone ou la rapamycine (Dixon et al., 2012). Ces données confirment le fait qu'il existe bien une régulation génétique propre à la ferroptose.

### 3. Les cibles de l'érastine

#### A. Les voltage-dependent anion channels (VDAC)

Les VDAC ou porines sont des protéines membranaires majeures intégrées dans la membrane mitochondriale externe. Elles sont codées sous trois isoformes (VDAC 1 à 3), et jouent un rôle dans le métabolisme et la mort cellulaire.

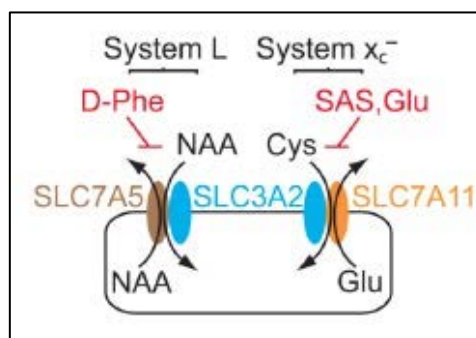
En tant que canal, dans des conditions physiologiques, le VDAC régule le passage des métabolites, des ions et de molécules d'eau à travers la membrane externe mitochondrial, mais il peut également participer à la perméabilisation de la membrane mitochondriale et être un point de contrôle de l'apoptose dans des conditions pathologiques.

Dans les cellules sensibles à l'érastine il a été observé une up-régulation de ces VDACs et le KO de VDAC 3 dans des cellules cancéreuses confère une protection contre la ferroptose. Dans une moindre mesure, le KO de VDAC 2 protège également les cellules de l'érastine. En revanche la surexpression de VDAC 2 ou VDAC 3 n'augmente pas la sensibilité des cellules à l'érastine suggérant que ce phénomène soit nécessaire mais pas suffisant pour engendrer la ferroptose. Enfin une étude d'affinité a permis aux auteurs d'observer que l'érastine se liait directement à VDAC 2, cette liaison engendrant un « switch » dans la sélectivité ionique du canal (Yagoda et al., 2007).

#### B. Le système X<sub>c</sub>-

Le système X<sub>c</sub>- est un transporteur situé à la surface de la cellule. Il est responsable et nécessaire au maintien de l'homéostasie redox, à la pigmentation de la peau, au système immunitaire, et à la formation de la mémoire (Bundel et al., 2011; Chintala et al., 2005; Sato et al., 2005). Ce transporteur est un antiport qui importe une molécule de cystine à partir de l'extérieur de la cellule en échange d'une molécule de glutamate à l'intérieur de la cellule. La cystine va former la cystéine qui est essentiel pour la synthèse de nouvelles protéines et pour empêcher l'accumulation d'espèces toxiques à l'intérieur de la cellule car elle est l'un des constituants du GSH.

Ce système est composé de deux sous-unités transmembranaires, la sous-unité SLC7A11 reliée par un pont disulfure à la sous-unité SLC3A2. Cette dernière est commune avec un autre système, celui des acides aminés neutres (NAA, système L), dont fait partie la tyrosine qui est le précurseur de la dopamine. Ce système est formé par la sous-unité SLC7A5 (**figure 15**).



**Figure 15 : Composition des systèmes Xc et L impliqués dans la ferroptose (Dixon et al, 2012).** Abréviations : NAA : Acide aminé neutre ; Cys : Cystéine ; Glu : Glutamate

L'inhibition du système X<sub>c</sub><sup>-</sup> par la sulfasalazine (SAS) peut déclencher la ferroptose, tandis que l'augmentation de la cystine dans les cellules par absorption du β-mercaptoéthanol inhibe la ferroptose induite par l'érastine. Dixon *et al.* ont observé une up-régulation de la sous-unité SLC7A11 en compensation de l'inhibition du système Xc. Ainsi la suppression de son expression par un siRNA augmente la sensibilité des cellules à l'érastine alors que sa surexpression confère une protection vis-à-vis de l'érastine. Une analyse d'affinité a permis aux auteurs d'observer que l'érastine se lie directement à la sous-unité SLC7A5 et propose l'hypothèse que cette liaison engendre des modifications de la conformation du complexe SLC3A2/SLC7A11 qui bloque le système Xc avec pour conséquence finale la diminution de la synthèse de GSH.

Cette hypothèse ayant été confirmée par le fait que le buthionine sulfoxamine (BSO), un agent qui déplete le glutathion, engendre une mort par ferroptose (Dixon et al., 2012a; Yagoda et al., 2007a).

#### *i. Le système Xc- et l'excitotoxicité du glutamate (Oxytosis)*

Le système X<sub>c</sub><sup>-</sup> est également la cible du glutamate. Un excès de glutamate va conduire à l'inhibition du système X<sub>c</sub><sup>-</sup> engendrant également une déplétion en glutathion et à une peroxydation lipidique. Mais bien que la ferroptose et l'oxytose possèdent un mécanisme de déclenchement commun (inhibition de Xc-) et un mécanisme d'exécution commun (peroxydation lipidique), ils existent de nombreuses différences entre ces deux types de mort cellulaires. L'oxytose est caractérisée par un influx calcique qui n'est pas observé dans la ferroptose (Berghe et al., 2014) mais est surtout caractérisé par l'implication des lipoxygénases (LOX), enzyme responsable de la peroxydation des lipides et une augmentation de la délocalisation du facteur d'induction de l'apoptose (AIF) des mitochondries vers le noyau (Conrad et al., 2016) (**Figure 13**).

#### **4. Le régulateur de la ferroptose : la glutathione peroxidase 4 (GPx 4).**

Cette dernière observation associée au fait que l'érastine inhibe le système Xc conduisant à la diminution de la synthèse de GSH a ouvert un grand champ d'étude nécessaire à la compréhension du mécanisme d'action de la ferroptose.

Il a été observé que le traitement avec l'érastine ou le BSO diminue les taux de GSH et de GSSG. En revanche, l'ajout de GSH ou de N-acétylcystéine (NAC, un précurseur du GSH) dans le milieu de culture empêche la mort induite par l'érastine.

Cette déplétion en glutathion entraîne une diminution des capacités antioxydantes de la cellule ainsi qu'une inhibition des enzymes dépendantes du glutathion telles que les glutathion peroxydases (GPX) (Yang et al., 2014).

Les GPX catalysent la transformation de  $H_2O_2$  et des hydroperoxydes lipidiques respectivement en eau et en alcool à l'aide du GSH comme co-facteur (Brigelius-Flohé and Maiorino, 2013). La diminution de GSH induit par l'érastine s'accompagne d'une augmentation de l'oxydation du NADPH et des lysophosphatidylcholines (un marqueur de formation de ROS lipidiques) indiquant une baisse de l'activité de la GPX.

Chez les mammifères, ils existent 8 isoformes de GPx avec des expressions tissus-dépendantes et des spécificités de substrat (Brigelius-Flohé and Maiorino, 2013). Une analyse de données protéomiques réalisée par spectrométrie a permis à Yang *et al.* d'identifier la GPX4 comme un médiateur de la ferroptose. De plus, la diminution de l'expression de GPX4, dans des cellules cancéreuses, génère des ROS lipidique et induit la ferroptose soutenant l'hypothèse selon laquelle l'érastine induit cette mort cellulaire par inhibition de GPX4. A l'inverse, la surexpression de GPX4 empêche la mort cellulaire engendrée par tous les inducteurs de la ferroptose (erastine, RSL3, BSO) mais pas d'autres agents létaux (roténone, staurosporine) indiquant que GPX4 est un régulateur spécifique et robuste de la mort des cellules par ferroptose (Yang et al., 2014).

L'identification de GPX4 en tant que médiateur de la ferroptose est très intéressante car GPX4 est la seule enzyme qui peut réduire les hydroperoxydes lipidiques dans les membranes biologiques (Brigelius-Flohé and Maiorino, 2013) ce qui explique pourquoi les cellules traitées avec l'érastine affichent un taux de ROS lipidique très élevé lors de la ferroptose.



## 5. Les inhibiteurs de la ferroptose

Depuis sa découverte en 2012, de nombreux travaux ont étudié la ferroptose et de nombreuses molécules capables de contrer cette mort cellulaire ont été rapportées. La plupart de ces molécules sont des antioxydants (Trolox, Vitamine E, N-acetylcystéine, Glutathion,...), des chélateurs de fer (Déféroxamine, Ciclopirox, 2-bipyridyl) ou encore des inhibiteurs de kinases (U0126 : inhibiteur de MEK, SU6656 : inhibiteur de Src).

En plus de ces inhibiteurs non spécifiques, trois composés avec une activité anti-ferroptotique spécifique ont été découverts.

### A. Ferrostatine

En 2012, Dixon *et al* met en évidence le premier inhibiteur spécifique grâce à un criblage de 9 517 composés. Les auteurs baptisent cette molécule, ferrostatine-1 (Fer-1). Fer-1 est capable d'inhiber spécifiquement la mort cellulaire induite par l'éraستine dans des cellules cancéreuses. L'activité de la ferrostatine-1 dépend de l'amine aromatique primaire, qui inhibe spécifiquement l'accumulation de ROS lipidique en agissant directement sur la GPx4 (Dixon et al., 2012 ; Yang et al., 2014).

Plus tard, des ferrostatines de seconde génération (appelé SRS 11-92) et de troisième génération (appelés SRS 16-86) ont été identifiées. Ces molécules ont une meilleure stabilité plasmatique et métabolique.

Dans un modèle *in vivo* d'une lésion d'ischémie-reperfusion rénale, ces deux molécules protègent la fonction rénale et augmentent la survie des souris après une lésion d'ischémie-reperfusion en inhibant l'oxytose (Linkermann et al., 2014; Skouta et al., 2014)

### B. Liproxstatine-1

La liproxstatin-1 (LPX-1) est un dérivé de spiroquinoxalinamine, plus liposoluble que la ferrostatine-1, capable de passer la BHE. LPX-1 prévient également la mort cellulaire induite par les inducteurs de la ferroptose (éraستine, RSL3 et BSO) mais n'a aucun effet sur la mort induite par apoptose ou par nécrose ce qui indique que la liproxstatine-1 est un inhibiteur spécifique de la ferroptose. Lorsque la liproxstatine-1 est administrée à des souris avec un KO de GPX4 inductible, elle retarde l'insuffisance rénale aiguë provoquée par ce KO et prolonge la survie des souris. La liproxstatine-1 protège également contre les lésions d'ischémie-reperfusion hépatique induite chez la souris (Friedmann Angeli et al., 2014).

### C. Zileuton

Le zileuton est un inhibiteur spécifique de la 5-lipoxygénase, actif par voie orale et utilisé dans le traitement de l'asthme. Les lipoxygénases (LOX) sont les enzymes responsables de la peroxydation lipidique. Etant donné que la ferroptose est caractérisée par l'accumulation de concentrations létales de lipides peroxydés, les auteurs ont utilisé cet inhibiteur sur une ligné cellulaire hippocampique (HT22). Le zileuton empêche la mort induite par l'érastine et le glutamate sur ces cellules en inhibant la production de ROS (Liu et al., 2015). Ce résultat suggère une fois de plus un mécanisme commun entre la ferroptose et l'oxytose.

## 6. Ferroptose et dérèglement cellulaire

### A. Cancers

La ferroptose a été découverte dans le cadre de la lutte contre les cancers et c'est donc dans ces pathologies qu'elle a été la plus étudiée. Ainsi l'érastine a été testée dans 117 lignées cellulaires cancéreuses provenant de divers tissus.

Parmi toutes ces lignées, les cellules cancéreuses du rein et les lignées leucémiques sont les plus sensibles à l'érastine par rapport aux cellules cancéreuses des six autres tissus (poumon, côlon, système nerveux central, mélanocytes, ovaires et sein) (Yang et al., 2014a).

L'érastine améliore également les médicaments de chimiothérapie tels que le témozolomide, le cisplatine, la cytarabine/ara-C, et la doxorubicine/adriamycine) dans certaines cellules cancéreuses (Chen et al., 2015; Yu et al., 2015).

Ainsi l'induction de la ferroptose par des médicaments approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA) tels que le sorafenib, la sulfasalazine et l'artésunate détient un grand potentiel pour le traitement du cancer.

### B. Les maladies neuronales

Bien que les cancers et les maladies neurodégénératives soient deux grandes familles de maladies bien distinctes, il existe un certain nombre de processus biologiques commun à ces deux familles à commencer par l'activation et la dérégulation du cycle cellulaire. Dans le neurone, le résultat final est une mort cellulaire programmée alors que la cellule cancéreuse échappe à cette mort programmée et entre dans une prolifération incontrôlée. Ainsi, la cellule cancéreuse et le neurone en dégénérescence partagent donc une étape clé dans leur entrée anormale et physiopathologie du cycle cellulaire (Driver, 2012).

Mais cette hypothèse du cycle cellulaire n'est pas le seul lien entre le cancer et la neurodégénérescence. Dans ces deux grandes familles, les concentrations des espèces réactives de l'oxygène (ROS), produites essentiellement par la phosphorylation oxydative mitochondriale, est augmentée. De plus, la surproduction de ROS peut améliorer la peroxydation des acides gras dans les membranes mitochondriales. Des modifications covalentes des protéines mitochondriales par les produits de la peroxydation lipidique, au cours du stress oxydatif cellulaire, sont impliqués dans les dysfonctionnements mitochondriaux observés dans le cancer et les maladies neurodégénératives (Barrera et al., 2016).

Ces observations ont donc rendu pertinente l'étude d'une possible implication de la ferroptose dans les maladies neuronales.

En ce sens, Skouta *et al.* ont observé que Fer-1 protège de la mort cellulaire induite par la surexpression d'une protéine huntingtine mutée dans un modèle de cultures organotypique de la maladie de Huntington. Toujours dans ce modèle, Fer-1 est également capable de protéger la mort des neurones moyens épineux (MSN) qui sont les cellules nerveuses les plus atteintes dans cette pathologie (Skouta et al., 2014).

Les auteurs ont également testé les effets de la ferrostatine-1 dans un modèle *in vitro* de leucomalacie périventriculaire (PVL), un syndrome causé principalement par l'altération des oligodendrocytes. Il a été suggéré que la mort de ces oligodendrocytes est dépendante du fer associé à un des taux élevé de ROS lipidiques (Inder et al., 2002; Volpe, 2001) suggérant l'implication de la ferroptose. Dans ce modèle la mort induite par une déplétion en glutathione est entièrement contrecarrée par Fer-1 (Skouta et al., 2014).

# **OBJECTIFS DE NOTRE TRAVAIL**

La maladie de Parkinson a été décrite pour la première fois il y a environ 200 ans. Au fil des années, et des découvertes, la recherche sur cette maladie a suivi diverses voies. Lorsque j'ai entrepris ce travail de thèse, le travail de recherche que suivait mon équipe était axé autour de l'accumulation des niveaux et des dépôts de fer qui ont été observés dans la substance noire des parkinsoniens. Nous avions au laboratoire un nouveau modèle très intéressant de culture de neurones dopaminergiques d'origine humaine (les LUHMES). A l'aide de ce modèle on me proposa de mettre en place les expériences nécessaires pour comprendre les mécanismes impliqués dans cette toxicité accrue du fer.

Suite aux généralités sur la maladie de parkinson, tout au long de cette introduction j'ai donc essayé de regrouper les différents éléments qui permettraient d'expliquer pourquoi les cellules dopaminergiques seraient particulièrement sensibles à une toxicité lié à l'accumulation de fer. Stress oxydant dû au métabolisme de la dopamine, agrégation de l'alpha-synucléine, rôle de la neuromélanine, réaction de fenton, et bien d'autres facteurs liés y sont décrit. J'ai aussi essayé de décrire le métabolisme du fer au niveau cérébral et comment sa dérégulation pouvait altérer la survie des neurones dopaminergiques. L'étude de ces différents points et l'impact de l'utilisation de chélateurs de fer sur la survie de neurones dopaminergiques étant les pistes de recherche que nous avons envisagée.

Une découverte qui nous a semblé très importante, bien que n'ayant aucun lien apparent avec la maladie de Parkinson, fut publiée en 2012. En effet, pour la première fois Dixon et al. décrivaient une nouvelle forme de mort cellulaire, appelée ferroptose strictement dépendante de la présence de fer (et d'aucun autre métal). La ferroptose pouvait toucher des cellules cancéreuses (ras dépendante) mais aussi une lignée de neuroblastomes murins (HT22) utilisée comme modèle de neurones de l'hippocampe. Entre autres faits remarquables, la ferroptose est liée à la forte augmentation du stress oxydant lipidique et partage des liens avec l'exotoxicité. J'ai donc étudié, de manière exhaustive, la bibliographie sur cette nouvelle forme de mort cellulaire programmée. La ferroptose étant morphologiquement, biochimiquement et génétiquement totalement distincte des autres formes de mort cellulaires connues telle que l'apoptose, la nécrose ou l'autophagie j'en ai souligné les différences dans l'introduction.

C'est l'ensemble de ces données, qui vont de l'impact de l'accumulation de fer sur la mort des cellules dopaminergiques dans la maladie de Parkinson aux moyens d'études de la ferroptose in vitro qui nous a convaincu qu'il était particulièrement pertinent d'entamer des études sur le lien possible entre la ferroptose et la mort des cellules dopaminergique.

Dans la suite du manuscrit (après la section matériel et méthodes) je présenterai les résultats de mes travaux. La première partie regroupe les expériences sur la toxicité du fer et les cellules LUHMES. Expériences nous amenant à conclure que les LUHMES semblent être un type cellulaire particulièrement adapté à l'étude (i) des différentes formes de mort cellulaire induites par le fer et (ii) des moyens de la contrer à l'aide de chélateurs de fer.

La seconde partie du travail, toujours sur les LUHMES, a été consacrée à l'étude de l'implication de la ferroptose dans les neurones dopaminergiques. Par cette approche cellulaire nous avons voulu observer (i) si des inducteurs spécifiques de cette mort pouvaient être efficace pour induire la mort des cellules dopaminergiques et (ii) si l'inhibition de la ferroptose pouvait protéger de la mort induite par des neurotoxines classiquement utilisées dans les études sur la maladie de Parkinson. Nous avons également étudié les voies de signalisation pouvant être impliquées et identifié de nouvelles voies de régulation de cette ferroptose. Voies qui semblent être propres aux neurones dopaminergiques

Dans la troisième partie nous avons voulu sortir du modèle des LUHMES et avons poursuivi nos études sur des modèles plus complexes. La ferroptose a ainsi été étudiée sur des cultures organotypiques de cerveau de rat et dans le modèle murin le plus usité de la maladie de Parkinson (la souris MPTP). Les résultats obtenus sur les LUHMES ont été confirmés, ce qui nous a permis de généraliser nos conclusions.

Nos résultats suggèrent fortement que le développement d'inhibiteurs spécifiques de la ferroptose pourrait être des molécules à utilisation thérapeutique dans la maladie de Parkinson. Je conclurais donc ma thèse quant à l'intérêt de notre travail sur une pathologie où aucun traitement curatif n'existe et où les recherches thérapeutiques en vue d'obtenir une neuro-protection préventive ou curative ne cessent de se développer.

# **MATERIEL ET METHODES**

Tous les réactifs utilisés proviennent de chez Sigma (St Louis, MO, USA). Dans le cas contraire, l'origine du fournisseur est mentionnée.

## I. Culture cellulaire

Toutes les études *in vitro* de ce travail de thèse ont été réalisées sur les cellules LUHMES. Ces cellules, nous ont été offertes par l'équipe du Pr. Marcel Leist, équipe qui a caractérisé la lignée, du laboratoire « Toxicologie *in vitro* et biomédecine » de l'université de Constance (Allemagne).

### 1. Entretien des cellules

Les LUHMES sont maintenues en culture à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub>, dans un milieu de prolifération Advanced DMEM/F12 (Life Technologies) contenant un supplément N2 (Life Technologies), 2 mM de L-glutamine et 40 ng/ml de bFGF. Les cellules sont cultivées dans des flasques de 75cm<sup>2</sup> (T75) Nunclon™ préalablement coâtées avec une solution de 50 µg/ml de poly-L-ornithine et 1 µg/ml de fibronectine. Le passage des cellules est réalisé tous les 2 jours. Pour cela, les LUHMES sont lavées avec 10 mL de PBS 1X stérile (Phosphate Buffer Saline: NaCl 154 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,543 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 2,7 mM) puis dissociées à l'aide de 4mL de trypsine EDTA 1X (Gibco-Invitrogen). Les cellules sont comptées grâce à un compteur de cellules automatique Scepter™ puis les cellules sontensemencées dans une T75 avec une densité de 4 x 10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup>

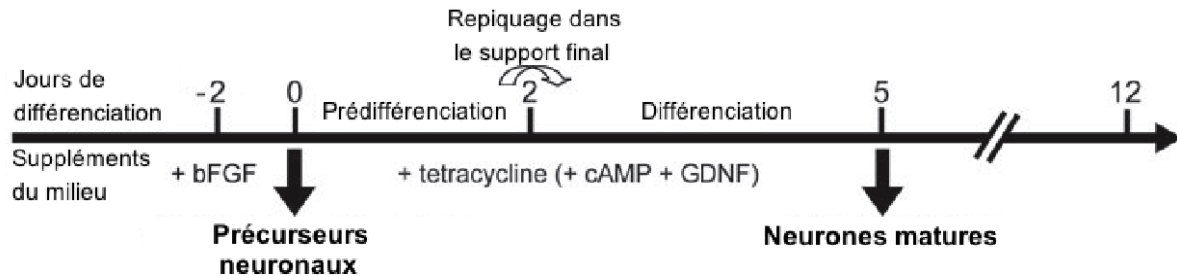
### 2. Différenciation des cellules

Après 48h, la pré-différenciation est lancée (d0), le milieu de prolifération est changé pour un milieu de différenciation Advanced DMEM/F12 (Life Technologies) contenant un supplément N2 (Life Technologies), 2 mM de L-glutamine, 1 mM dibutyryl 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP), 1 ng/ml de bFGF et 2 ng/ml de GDNF recombinant humain (R&D Systems).

Après 48 heures de pré-différenciation (d2), les cellules sont lavées avec 10 mL de PBS 1X stérile puis dissociées à l'aide de 4mL de trypsine. Après 5 minutes d'incubation en présence de l'agent dissociant, les cellules se décollent du fond de la boîte et peuvent être remises en suspension dans un volume de milieu déterminé en fonction de la dilution souhaitée.



La suspension cellulaire est homogénéisée par aspiration/refoulement à l'aide d'une pipette avant d'être répartie dans le support final qui diffère en fonction des expérimentations à une densité de  $1,4 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>. La différenciation continue ensuite pendant 3 jours avant que les cellules LUHMES soient devenues des neurones matures (d5).



**Figure 16 : Time-course de la différenciation des cellules LUHMES (adapté de Scholz et al., 2011)**

### 3. Les traitements

Pour les expérimentations de cette thèse, les différents traitements des cellules LUHMES ont toujours été réalisés au 5<sup>ème</sup> jour de différenciation (d5).

## II. Cytométrie de flux

La cytométrie de flux (CMF) se définit comme l'étude précise des particules isolées (cellules, bactéries, etc.) entraînées par un flux liquide. La CMF se distingue des autres techniques analytiques car elle réunit les cinq caractéristiques essentielles suivantes: analyse quantitative, sensibilité de détection, rapidité, analyse multiparamétrique et tri cellulaire.

La CMF consiste à analyser les signaux optiques et/ou physiques coupant le faisceau lumineux d'un laser. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs :

- aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule, à leur structure interne ou à l'auto fluorescence de certaines cellules.
- aux propriétés optiques induites de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires.

La taille et la granularité (ou structure) de chacune des cellules sont fournis grâce à la diffusion lumineuse (dans l'axe du laser ou à 90°). En outre, les molécules fluorescentes présentées par la cellule sont excitées grâce à la source lumineuse.

Pour cela, une étape de marquage préalable est nécessaire avant le passage des cellules dans un cytomètre. Ce marquage est réalisé avec des molécules spécifiques d'une structure ou d'une fonction cellulaire, susceptibles d'émettre une fluorescence après leur illumination; il s'agit de fluorochromes spécifiques (intercalants) ou d'un immunomarquage fluorescent (anticorps marqués). Les cellules sont réparties en fonction des paramètres étudiés, et chaque cellule est transformée en un "évènement électrique" (event) associé à plusieurs coordonnées (granularité, taille, fluorescence 1, fluorescence 2). L'ensemble des évènements constituent des nuages de points (sur des cytogrammes) autour desquels des fenêtres électroniques sont dessinées (gating).

Les paramètres biologiques sont exprimés en pourcentages ou en unités arbitraires et évalués sur des sous-populations cellulaires.

## 1. Préparation des échantillons

Pour les études de cytométrie, les cellules LUHMES sont mises à d2 en plaque 24 puits à une densité de  $1,4 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>. Au 5<sup>ème</sup> jour, les cellules sont traitées. A la fin des traitements, les échantillons sont préparés sur glace.

Le milieu est récupéré dans un tube à hémolyse. Les cellules sont dissociées avec 200 µl de trypsine pendant 5 minutes à 37°C puis centrifugées à 2000 rotations par minute (rpm) pendant 5 minutes. Le surnageant est ensuite retiré à la pompe à vide et les cellules resuspendues dans 300 µl de PBS. Selon le paramètre que l'on veut mesurer, on y ajoute la sonde cytométrique correspondante (**tableau I**).

Les cellules sont ensuite analysées par un cytomètre de flux LSR Fortessa X20 (BD Immunocytometry Systems) équipé de laser Argon de 488 et 561 nm en prenant en compte 10 000 cellules. Les données sont ensuite analysées par le logiciel DIVA Software (BD Immunocytometry Systems).

**Tableau I : Sondes cytométriques utilisées**

	Paramètres mesurés	Concentration initiale	Concentration finale
Iodure de propidium (IP)	Survie cellulaire	1mg/ml	0,5µg/ml
Annexine V	Survie cellulaire		
DIOC	Potentiel mitochondrial	4mM	40nM
Hydroéthidine (HE)	Stress oxydant cytosolique	16mM	2.5µM
C-11 Bodipy	Stress oxydant lipidique	10mM	1µM
MitoSox	Stress oxydant mitochondrial	1,25mM	1µM

## 2. Mesure de la viabilité cellulaire

L'iodure de propidium (IP) est un agent fluorescent intercalant des acides nucléiques (ADN; ARN). Il est utilisé pour quantifier la viabilité cellulaire ; il ne colore que les acides nucléiques des cellules mortes qui ont perdu leur intégrité membranaire. L'IP s'excite à 305 et 538 nm et il émet une fluorescence orange/rouge avec un maximum d'émission 617 nm.

La solution mère d'IP est préparée dans de l'eau milliQ à la concentration de 1 mg/mL. Cette solution est stockée à +4°C à l'abri de la lumière. Pour évaluer la mortalité, les cellules sont reprises dans une solution d'IP à 0,5 µg/mL dans le PBS. Après une incubation de 15 min à 37°C, les cellules sont analysées par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules mortes correspond au pourcentage de cellules IP positive.

## 3. Mesure des différents stress oxydants

### A. Stress oxydant cytosolique

La production intracellulaire d'anion Superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) a été détectée avec la dihydroéthidine DHE (Molecular Probes/Invitrogen). La DHE est un composé nonfluorescent qui peut diffuser à travers les membranes cellulaires et qui est rapidement oxydé en ethidium fluorescent ( $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{em} = 575 \text{ nm}$ ) sous l'action d' $O_2^{\cdot-}$ .

L'ethidium se fixe ensuite de façon covalente au niveau des bases azotées de l'ADN. Ceci permet sa rétention dans la cellule et donc sa détection par cytométrie en flux (Figure 19).

La solution mère de DHE a été préparée dans du DMSO à une concentration de 16 mM. Cette solution est par la suite utilisée sur les cellules à la concentration finale de 2,5  $\mu$ M. Après 15 min d'incubation à 37°C, l'analyse est réalisée par cytométrie en flux.

### **B. Stress oxydant mitochondrial**

La production mitochondriale d'anions superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ) a été détectée avec le MitoSOX (Molecular Probes/Invitrogen). Le MitoSOX™ Red est un dérivé cationique de la dihydroéthidine. Il pénètre dans les cellules vivantes et se fixe spécifiquement aux mitochondries. Une fois dans la mitochondrie, le MitoSOX™ Red est oxydé par les anions superoxydes et émet une fluorescence rouge ( $\lambda_{ex} = 510$  nm ;  $\lambda_{em} = 580$  nm).

La solution de MitoSOX qui a été initialement préparée à 1,25 mM dans du PBS est utilisée sur les cellules à 1  $\mu$ M. Les cellules ont été incubées pendant 15 min à 37°C avant d'être analysées au cytomètre.

### **C. Stress oxydant lipidique**

La peroxydation lipidique a été mesurée avec le C11-BODIPY 581/591 (Molecular Probes). Cette sonde est intrinsèquement lipophile, elle va donc pouvoir facilement entrer dans les cellules par la membrane plasmique. Tant que le système conjugué de ce fluorophore est intact, la fluorescence observée est rouge (591 nm). Lors de l'oxydation de ce conjugué, on observe un shift de la fluorescence rouge vers une fluorescence verte (510 nm). La solution de C11-BODIPY 581/591 a été initialement préparée à 10 mM dans du DMSO est utilisée sur les cellules à 1  $\mu$ M. Les cellules ont été incubées pendant 20 min à 37°C avant d'être analysées au cytomètre.

## **III. Analyses biomoléculaires**

Pour les études biomoléculaires, les cellules LUHMES sont mises en plaques 6 puits et traitées au 5<sup>ème</sup> jour de différenciation (d5). A la fin des traitements, le milieu de culture est retiré à la pompe à vide et la plaque est mise au -80°C pendant 24 heures.

### **1. Extraction des ARN**

Après 24 heures au -80°C, les cellules sont traitées avec 500  $\mu$ l d'Extract-all (Eurobio) pour lyser les cellules. Après 5 minutes pour permettre la dissociation des complexes nucléoprotéiques et l'ajout 100  $\mu$ l de chloroforme, les échantillons sont

centrifugés à 10 000 g durant 10 minutes à 4°C. Trois phases sont formées dont la phase aqueuse supérieure incolore qui contient exclusivement les ARN. Afin que les ARN précipitent, la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube avec 250 µl d'isopropanol. Ce mélange est à nouveau centrifugé à 13 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé puis le culot est lavé avec 500 µl d'éthanol 75% pour 500 µl d'Extract-all utilisé au départ. Le culot d'ARN est séché à l'air libre et dissout dans de l'eau ultra-pure (Eurobio). La concentration de la préparation finale d'ARN totaux est dosée par le Nanodrop® sur la plateforme d'interactions moléculaires de l'IMPRT. La solution est libre de contaminants si les ratios de la densité optique A260nm/A280nm et A230nm/A260nm sont supérieurs à 1,8 et inférieurs à 2,2.

## 2. Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)

Les possibles traces d'ADN sont dégradées grâce à une étape enzymatique assurée par la DNase. Le mélange réactionnel est composé de 5 µl de tampon 10X de l'enzyme (Roche), 1 µl de DNase I et 2 µg d'ARN. Il est ajusté avec de l'eau en quantité suffisante pour obtenir un volume final de 50 µl.

Il est ensuite incubé à 37°C afin d'activer l'enzyme durant 40 minutes, et à 75°C, température qui permet d'inactiver l'enzyme, pendant 25 minutes.

L'étape suivante consiste en la conversion de l'ARN en ADNc par l'activité de l'enzyme reverse transcriptase. Le mélange réactionnel est formé de 25 µl de solution d'ARNm (1g), 8 µl de tampon 5X (5X First Strand Buffer, Invitrogen™), 0,5 µl d'enzyme SuperScript® III, 2 µl d'hexameres (Random Primer, Invitrogen™) afin d'amorcer la réaction, 1 µl d'oligodT 0,1M (Invitrogen™) et 1 µl de nucléotides (dNTP à 10mM, Invitrogen™) pour l'élongation des brins afin d'obtenir un volume final de 37,5 µl.

Le mélange subit ensuite une étape d'hybridation (10 minutes à 24°C), l'élongation de l'ADNc (40 minutes à 50°C) et la désactivation de l'enzyme (15 minutes à 75°C). Le volume du mélange est ensuite ajusté avec de l'eau en quantité suffisante pour un volume final de 200 µl.

## 3. PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel repose sur le suivi temporel du processus de PCR à l'aide de la détection de l'intensité de fluorescence. La quantification de l'ADNc répliquée en temps réel est permise par la mesure du nombre d'amplicons, sur lesquels se sont fixés des fluorophores SYBR Green, spécifiques de l'ADN, à chaque cycle.

Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal est significativement supérieur au seuil de détection de l'appareil. Ce point est défini comme le *crossing point*. Afin de vérifier la qualité des ADNc, une première amplification par PCR quantitative est effectuée sur un gène de référence la TATA Binding Protein (TBP) dont l'expression ne varie pas dans notre étude. Le mélange réactionnel est constitué de 1 µL de la solution tube 1 (10 µL du tube 1a, LightCycler® FastStart Enzyme dans le tube 1b LightCycler® FastStart Reaction Mix SYBR Green), 1,2 µL d'eau qsp, 0,8 µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 2 µL de l'amorce sens de la TBP à 3 µM (TIB® MOLBIOL), 2 µL de l'amorce anti-sens de la TBP 3 µM (TIB® MOLBIOL). Il est déposé dans des capillaires (LightCycler® capillaries, Roche) qui sont ensuite centrifugés.

La PCR en elle même est réalisée automatiquement par le thermocycleur LightCycler® Instrument (Roche) selon les étapes suivantes : un cycle de huit minutes à 95°C suivi de 45 cycles répétés de 10 secondes de dénaturation à 95°C, 10 secondes d'hybridation à 60°C et 10 secondes d'élongation à 72°C. Une courbe de fusion est établie permettant de vérifier la spécificité des amplicons.

#### 4. Transfection des siRNA

La transfection est réalisée à d2 lors du repiquage dans le support final. On prépare une solution A qui consiste en 1 µl de Lipofectamine™ 2000 (Life Technologies) et 37,5 µl d'Opti-MEM (Life Technologies, CA, USA). La solution est mixée gentiment et incubée 5 minutes à température ambiante. La solution B consiste en 15 pmoles de siRNA et 37,5 µl d'Opti-MEM□□

Après 5 minutes d'incubation, les deux solutions sont combinées et incubées pendant 25 minutes avant d'être transférées dans une plaque 24 puits. Les taux indiqués sont ceux d'un seul puits.

Les cellules LUHMES prédifférenciées sont ensuite ajoutées dans le puits à une densité de  $3,5 \times 10^5$  cellules par puits. Le milieu est changé 24h après le repiquage (d3). Après deux jours de différenciation de plus, les cellules sont traitées. Les siRNAs pour la PKC et le *scramble siRNA* proviennent de Santa Cruz Biotechnology.

## IV. Western Blot

### 1. Préparation et dosage des échantillons

Pour le dosage de protéines par Western-Blot, les LUHMES sont mises en cultures dans des flasques de 25cm<sup>2</sup> (T25) à une densité de 2,4x10<sup>5</sup> cellules/cm<sup>2</sup>. Les cellules sont traitées au 5<sup>ème</sup> jour de différenciation (d5). Au terme des différents temps de traitements, on extrait les protéines sur glace.

Le milieu de culture est retiré de la T25 et les cellules sont grattées dans un volume de 1 mL de PBS 1X froid. Le liquide est transféré dans un eppendorf de 1,5 mL. Après centrifugation à 4000 g pendant 20 minutes à 4°C et élimination du surnageant, le culot est resuspendu dans une solution de 100 µl de tampon RIPA (Biorad, France) additionné d'inhibiteur de protéases et de phosphatases. Les échantillons subissent ensuite une série de cinq sonications de cinq secondes à 70% d'amplitude puis sont à nouveau centrifugés à 16 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Enfin le surnageant est récupéré et dosé.

Le dosage est réalisé à l'aide du kit DC Protein Asssay kit II (Biorad, France). Ce kit permet le dosage colorimétrique de protéines selon la méthode de Lowry, en plaques 96 puits. Les échantillons sont dilués au 1/10ème. Une gamme d'étalonnage d'albumine bovine est réalisée en parallèle, comprenant 8 points de concentration croissante de 0 à 1,5 mg/mL. Chaque point est doublé, la concentration finale retenue étant la moyenne des deux mesures. La lecture est faite sur lecteur de microplaque à 690 nm.

### 2. Migration et séparation

Le témoin de masse utilisé couvre une gamme de poids moléculaire de 10 kDa à 260 kDa (Thermo Scientific). Les gels de l'électrophorèse des protéines sont des gels Tris-glycine de 12% (Mini-Protean®, Biorad). Au volume correspondant à 50 µg de protéines est ajouté un volume de 7 µl tampon de Laemmli contenant 10% de β-mercaptoéthanol et du tampon RIPA en quantité suffisante pour un volume final de 21 µl. Le mélange est chauffé 5 minutes à 90°C, puis déposé dans le puits.

La migration est réalisée à ampérage constant à 35 mA par gel, dans un tampon de migration Tris/Glycine/SDS (Biorad, France) et dure environ 30 minutes.

Le gel est ensuite placé au contact d'une membrane PVDF (GE Healthcare, Royaume-Uni), préalablement activée avec de l'éthanol 100% entre deux feuilles de papier Wattman imbibées de tampon de transfert Tris/Glycine (Biorad, France) et le transfert est réalisé par application d'un courant en ampérage constant de 0,35A pendant 2h.

### 3. Immunodétection des protéines d'intérêt

Après le transfert des protéines, les membranes sont bloquées dans une solution de Tris-buffered saline/0.1% Tween (TBST) avec 5% de lait pendant 1 heure à température ambiante, pour bloquer les sites d'interactions non spécifiques, puis dans une solution de lait à 5% contenant l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt (**tableau II**) à 4°C pendant la nuit.

Après lavage, les membranes étaient mises à incuber 2 heures à température ambiante, à l'abri de la lumière, sous agitation douce avec un anticorps secondaire couplé à une peroxydase HRP. La révélation se faisait par chimiluminescence, au moyen du kit Amersham ECL (GE Healthcare, Royaume-Uni) et par l'ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Royaume-Uni). Après numérisation, les valeurs de densité optique étaient évaluées au moyen du logiciel ImageJ.

**Tableau II : Liste des anticorps utilisés**

	Espèce	Dilution	Fournisseur
<b>Actine</b>	Lapin	1/1000	Santa Cruz
<b>P-MEK</b>	Lapin	1/1000	Cell signaling
<b>MEK</b>	Lapin	1/1000	Cell signaling
<b>P-ERK</b>	Souris	1/1000	Cell signaling
<b>ERK</b>	Lapin	1/1000	Cell signaling
<b>P-PKC</b>	Souris	1/200	Santa Cruz
<b>PKC</b>	Souris	1/200	Santa Cruz
<b>P-Akt</b>	Lapin	1/1000	Cell signaling
<b>Akt</b>	Lapin	1/1000	Cell signaling
<b>P-alpha-syn</b>	Souris	1/1000	Wako
<b>alpha-syn</b>	Souris	1/1000	BioLegend
<b>p-PLC gamma 1</b>	Lapin	1/1000	Cell signaling
<b>PLC</b>	Lapin	1/1000	Cell signaling



## V. Cultures organotypiques

### 1. Mise en culture

Des rats Sprague-Dawley de 7 jours sont sacrifiés par décapitation et le cerveau est prélevé. Les hémisphères cérébraux sont séparés et collés, par leur côté interne, sur le support en métal du vibratome. Des coupes sagittales de 400µm le long de la voie nigrostriée sont obtenues grâce au vibratome (Campden instruments, Loughborough, England). Les coupes sont ensuite collectées dans une solution de Grey froide supplémentée avec 6,5 mg/ml de glucose et des antibiotiques.

Une fois le nombre de coupes souhaité obtenu, les coupes sont transférées sur la membrane semi-poreuse d'un insert de 30 mm de diamètre (Millipore) dans une plaque 6 puits et mise en culture à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>

### 2. Maintien en culture

Du 1<sup>er</sup> jour de culture au 3<sup>ème</sup> jour de culture, le milieu de culture est constitué de 50% de MEM (Minimum Essential Medium Eagle, 25% de Hank's (Hank's Balanced Salt Solution), 25% de sérum de cheval (Gibco), 6,5mg/ml de glucose, 1 mM de L-glutamine et des antibiotiques.

A partir du 3<sup>ème</sup> jour et jusque la fin de la culture, le milieu de culture est remplacé par un milieu constitué de Neurobasal (Gibco) supplémenté avec 6,5mg/L de glucose, 1mM de L-glutamine, un supplément B27 (Gibco) et des antibiotiques. Ce milieu est changé tous les 2 jours.

### 3. Manipulations

#### A. Visualisation de la mort neuronale

Une fois les traitements terminés, pour visualiser la mort neuronale, le milieu de culture est retiré et les coupes sont lavées deux fois avec du PBS. Elles sont ensuite plongées dans une solution d'IP à 0,5 µg/ml pendant 30 minutes. Les coupes sont à nouveau lavées dans du PBS, décollées de la membrane de l'insert, séchées pendant 1 heure à l'abri de la lumière et montées entre lame et lamelle.

## B. Marquage immuno-TH de la voie nigro-striée

Pour visualiser l'effet des différents traitements sur la voie nigro-striée, le marquage immunohistochimique des neurones TH est réalisé. A la fin de la durée des traitements, les coupes sont fixées dans une solution de paraformaldéhyde 4% (PFA) pendant 3 heures puis elles sont décollées de la membrane de l'insert et mise en plaque 24 puits. Le reste de la manipulation se fait sur les coupes en « système flottant ». Elles sont lavées trois fois dans du PBS.

Une saturation des sites antigéniques est réalisée avec du sérum de chèvre dilué au 1/10<sup>ème</sup> dans une solution de PBS comprenant 4% d'albumine sérique bovine (BSA) et 1% de triton pendant 4 heures.

Après trois nouveaux lavages au PBS, l'anticorps anti-TH (Covance), dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans une solution de PBS comprenant 4% d'albumine sérique bovine (BSA) et 1% de triton, est incubé pendant 48 heures à 4°C.

A la fin de ces 48 heures, une étape d'inhibition des peroxydases endogènes à l'aide d'un mélange H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3% et triton 0,1% dans du PBS est réalisée. Les coupes sont lavées dans du PBS puis incubées avec l'anticorps secondaire pendant 2 heures à température ambiante.

L'anticorps secondaire est couplé à un complexe avidine-peroxydase (Vectastain ABC kit, Vector), puis l'activité enzymatique est révélée par réaction avec un mélange contenant la diaminobenzidine (DAB) diluée au 1/50<sup>ème</sup>, de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,03% et 2,5% de chlorure de nickel dans du PBS.

Les coupes sont ensuite séchées à température ambiante durant 1h30. Enfin, elles sont déshydratées dans des bains successifs croissants d'alcool puis de Clearen® et montées avec lamelles (milieu de montage DPX, CellPath).

## C. Analyse des images

Quelque soit la technique utilisée, une fois montées, les lames sont scannées grâce à l'AxioScan Z1 (Zeiss) de la plateforme d'imagerie cellulaire de l'IMPRT et analysées à l'aide du logiciel Zen.

## VI. Etudes in vivo

### 1. Animaux

Toutes les études *in vivo* présentées dans ce travail ont été réalisées sur des souris C57Bl/6J provenant du centre d'élevage Janvier. Ils disposaient d'un accès libre à l'eau et à la nourriture (régime standard) et séjournaient dans un environnement contrôlé à 20°C avec une alternance jour/nuit de 12 heures. Toutes les expériences sont effectuées selon les recommandations de la Directive du Conseil de la Communauté Européenne du 22 septembre 2010 (2010/63/EU).

### 2. Traitements

#### A. Traitement par le MPTP

Cette étude a obtenu l'approbation du Comité d'Ethique en Expérimentation Animale Nord - Pas de Calais (CEEA n°75)

Au début de l'expérience les animaux sont âgés de 5 mois et pèsent entre 28 et 30g.

Un protocole d'intoxication aigu par le MPTP a été utilisé. Les souris ont reçu 4 injections intra-péritonéales de 20mg/kg à 2 heures d'intervalle de MPTP dilué dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%). La dose cumulative de MPTP est donc de 80 mg/kg. Des groupes de souris contrôles recevaient le même nombre d'injections avec des volumes équivalents de sérum physiologique.

#### B. Prétraitements avec les agents pharmacologiques

Toutes les expérimentations réalisées *in-vivo*, ont eu pour objectif de montrer le possible effet neuroprotecteur des différents agents pharmacologiques testés. C'est pourquoi toutes les expérimentations ont été réalisées selon le même schéma, c'est-à-dire un prétraitement de l'agent pharmacologique puis, le lendemain, les injections de MPTP.

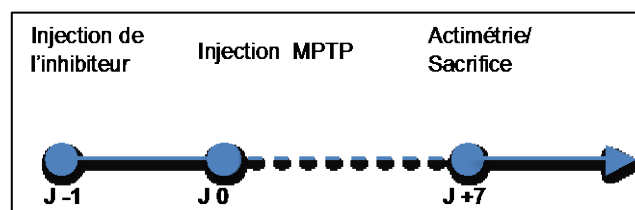


Figure 17 : Planification des expérimentations *in-vivo*

### *i. La ferrostatine-1*

La ferrostatine-1 (Fer-1) est le premier inhibiteur spécifique de la ferroptose découvert par Dixon *et al.* en 2012. Cette molécule n'est pas liposoluble, ainsi pour se passer des possibles problèmes de passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE), la ferrostatin-1 a été injectée par voie intracérébroventriculaire (icv).

Des souris C57BL/6J ont été anesthésiées par une anesthésie gazeuse à l'isoflurane et réalisée en circuit ouvert. L'isoflurane est administré en « boîte » d'anesthésie lors de l'induction puis administré par un masque tout au long de la chirurgie. A l'aide d'un cadre de stéréotaxie, les souris ont reçu une injection intracérébrale dans le ventricule droit de 1mM ou 2,5 mM de Fer-1 dans un volume total de 4  $\mu$ L. Les coordonnées étaient : médio-latéral : -1 mm ; antéro-postérieur : -0,2 mm ; dorso-ventral : -2,5 mm.

### *ii. La liproxstatine-1*

Un peu plus tard, en 2014, Friedmann *et al.*, en « screenant » plus de 40 000 molécules, découvre la liproxstatine-1 (Lpx-1), capable de passer la BHE. Nous avons donc utilisé cette molécule, la liproxstatine-1 sur des souris MPTP.

Cette molécule passant la BHE, elle a été administrée par voie intra-nasale. Un groupe de souris a donc reçu 2,5 mM de Lpx-1 dans un volume de 20  $\mu$ L. Le groupe ne recevant pas de Lpx-1 recevait le véhicule : DMSO 1% / PBS.

### *iii. L'inhibiteur de PKC (UCN-01)*

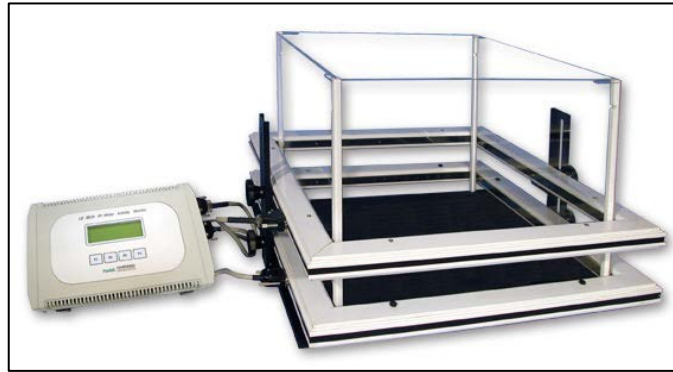
L'inhibiteur de PKC, UCN-01, a lui aussi été administré par voie intra-nasale, ce mode d'administration ne nécessitant pas d'anesthésie, il a donc été privilégié.

Cette molécule étant légèrement plus grosse que la liproxstatine-1, les souris ont reçu un volume de 40  $\mu$ L d'une solution d'UCN-01 à 0,5  $\mu$ M. Le groupe ne recevant pas UCN-01 recevait le véhicule : DMSO 1%/PBS.

## **3. Test de l'actimétrie**

L'actimètre (Panlab) permet de mesurer l'activité spontanée motrice de la souris durant un temps déterminé.

Le dispositif est composé d'une arène en plexiglas (45Lx45lx35H cm). Deux cadres d'une épaisseur de 3cm, composés de rangés de capteurs infrarouges, encadrant l'arène permettent d'enregistrer la dimension horizontale (activité motrice) et la dimension verticale (redressement de la souris). Le système infrarouge est relié à un boîtier convertisseur LE 8811 Motor Activity Monitor V, directement connecté à un PC.



**Figure 18 : Dispositif du test de l'actimétrie**

#### **4. Sacrifice des animaux**

Après le test d'actimétrie, les souris sont euthanasiées. Une dose létale de pentobarbital sodique (100 mg.kg-1) (Ceva Santé Animale) est injectée par voie intrapéritonéale. Dès l'absence de réflexe, une large thoraco-laparotomie est réalisée, permettant ainsi l'accès au cœur. Le ventricule gauche est cathétérisé et l'oreillette droite, incisée afin de pouvoir perfuser le rat à l'aide de serum physiologique hépariné, puis de paraformaldéhyde (PFA) à 4 %. Une fois la perfusion arrêtée, la souris est décapitée. La boîte crânienne est ensuite découpée sagittalement afin de prélever le cerveau.

#### **5. Immunohistochimie**

Celui-ci est placé dans du PFA pendant une nuit à 4 °C avant de subir une déshydratation. Dans le cadre d'une conservation à température ambiante, le cerveau est placé dans de l'éthanol 70° avant déshydratation dans des bains successifs et croissants d'éthanol et de Neo-Clear®. Suite à cette étape, les cerveaux sont inclus en paraffine. Les cerveaux sont coupés grâce à un microtome de type Leica RM2145. Les coupes d'une épaisseur de 6 µm sont placées sur des lames Superfrost® Plus Gold (Thermo Scientific). Celles-ci sont ensuite placées une nuit dans une étuve à 37 °C puis conservées à température ambiante avant utilisation.

La première étape de l'analyse immunohistochimique va consister en un déparaffinage qui se fait, cette fois, par des bain successifs et décroissant de Neo-Clear® puis d'éthanol. Les étapes suivantes sont une perméabilisation cellulaire (PBS, Triton 100X à 0,3%, 1 heure), une inhibition des peroxydases endogènes (PBS, 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30% méthanol, 30 minute) et un blocage des sites d'interactions non spécifiques (PBS, 10% sérum bloquant de chèvre, 1 heure).

Les coupes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire de lapin anti-TH (ab152, Millipore) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans une solution de 5% de sérum bloquant de chèvre dilué dans du PBS-Tween 0,02% pendant une nuit à 4°C. Après différents lavages dans du PBS-T puis du PBS, l'anticorps secondaire est déposé durant deux heures à température ambiante, après dilution dans du PBS-T.

L'utilisation du kit ABC (Vector) permet la fixation du complexe avidine-peroxydase puis, en présence du substrat, la diaminobenzidinetetrahydrochloride (DAB), l'activation de l'enzyme par de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour induire un marquage brunâtre. Enfin après une nouvelle déshydratation, les coupes sont montées d'une lamelle avec de l'acrytol. Après un séchage de 24 heures, les lames sont scannées grâce à l'AxioScan Z1 (Zeiss) de la plateforme d'imagerie cellulaire de l'IMPRT et analysées à l'aide du logiciel Zen

## VII. Cerveaux humains post-mortem

### 1. Description des pièces anatomiques

Les pièces d'autopsies ont été recueillies et préparées par le Centre de Ressources Biologiques du CHRU de Lille. Quatre régions d'intérêt ont été choisies à savoir le cortex préfrontal, le cortex occipital, le striatum et la substance noire. Les informations disponibles étaient le dossier clinique, les conditions de décès et le délai entre le décès du sujet et la congélation des échantillons (délai post mortem, DPM). Un résumé de ces données est présenté dans le **Tableau III**. Les sujets témoins étaient exempts de pathologie neurologique ou psychiatrique. Les analyses biomoléculaires de cette étude ont été réalisées sur les prélèvements de 3 sujets parkinsoniens et 3 sujets témoins. La moyenne d'âge au décès et le DPM n'étaient pas significativement différente entre les deux groupes (test t de Student).

**Tableau III : Caractéristiques des patients analysés**

N°	Diagnostic	DPM (heures)	AGE (années)	SEXE
C06-14473	Témoin	18	72	M
C06-26648	Parkinsonien	8	77	F
C08-19292	Témoin	24	80	F
C08-34459	Témoin	11	61	M
C09-11379	Parkinsonien	16	63	M
C09-57130	Parkinsonien	15	70	M

## 2. Préparation du tissu humain

Les échantillons se présentaient sous forme de blocs de tissus disséqués et étaient directement utilisables. Chaque échantillon est homogénéisé dans une solution d'Extract-all® (Eurobio), à l'ULTRA-TURRAX® (IKA® T10 Basic). Une fois bien homogénéisé, les étapes d'extraction des ARN sont identiques à celles présentées dans le chapitre IV.1.

## VIII. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyennes ou pourcentages  $\pm$  erreur standard à la moyenne. Les groupes sont comparés deux à deux en utilisant un test non paramétrique de Mann-Whitney. Les comparaisons entre plusieurs groupes, ont été effectuées avec une ANOVA de Kruskal-Wallis suivie d'une analyse post-hoc (méthode de Dunn).

Le seuil de significativité pour les tests statistiques était de 5 % ( $p < 0,05$ ). Toutes les analyses ont été effectuées grâce au logiciel GraphPad Prism 6 Software.

# **RESULTATS**

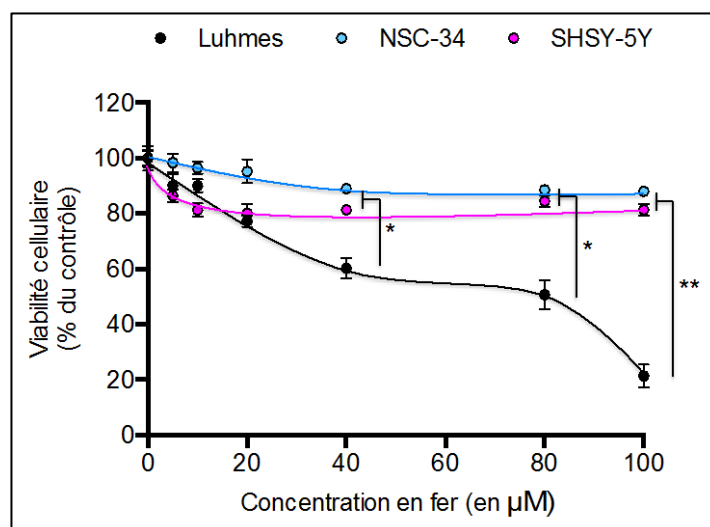


# I. Validation du modèle des LUHMES pour l'étude des effets délétères du fer

## 1. Effet du fer sur différentes lignées cellulaires

### A. Effet dose-réponse d'une gamme de fer

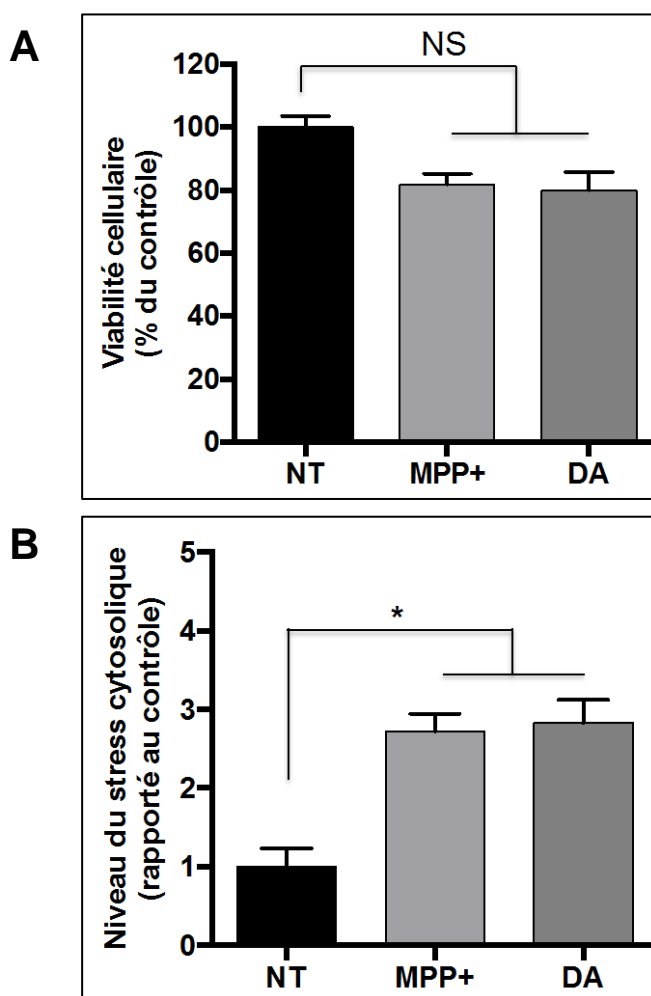
Nous avons testé les effets du fer, sous forme de citrate d'ammonium ferrique (FAC) sur ces trois lignées. La **figure 19** montre la viabilité cellulaire des trois lignées mesurées par cytométrie de flux après 24 heures de traitement au FAC. On remarque que dès la dose intermédiaire (40 $\mu$ M), les cellules LUHMES sont plus sensibles aux effets délétères du fer puisqu'environ 40% des de ces cellules sont tuées par le fer alors que seulement 20% des NSC-34 et des SHSY-5Y y sont sensibles. Cette tendance se confirme aux plus fortes doses (80 et 100 $\mu$ M) qui tuent, respectivement, 50% et 80% des cellules LUHMES, alors que ces mêmes doses ne tuent que 20% des NSC-34 et des SHSY-5Y.



**Figure 19 : Effet dose-réponse d'une gamme de fer (FAC) sur les cellules LUHMES, NSC-34 et SHSY-5Y. \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; n=3**

### B. Effet du fer en condition oxydante

Les effets délétères du fer en condition oxydante ont été testés sur les cellules LUHMES. Le stress oxydant est engendré par le MPP<sup>+</sup> mais également par la dopamine. Pour ces agents oxydants, nous avons choisi une dose capable d'augmenter le stress oxydant sans altérer la viabilité cellulaire (**Figure 20**).



**Figure 20 : Effets du MPP+ (2,5 $\mu$ M) et de la dopamine (DA, 2 $\mu$ M) sur la viabilité (A) et le stress oxydant (B) des LUHMES traitées pendant 48h. NS, non significatif ; \* $p$ <0,05 ; \*\* $p$ <0,01 ;  $n$ =3**

Les cellules étaient d'abord traitées pendant 24h avec la dose d'agent oxydant puis par une faible dose de fer (25 $\mu$ M). La **figure 21** montre clairement que dès 24h de traitement, l'ajout de 25  $\mu$ M de fer induit une mort cellulaire d'environ 30%. Celle-ci est accrue en condition oxydante puisqu'en présence de MPP+, le fer tue environ 70% des cellules (**figure 21A**). Il en est de même avec la dopamine où le fer en condition de stress oxydant tue environ 60% des cellules (**figure 21B**). En revanche, une dose de 100 $\mu$ M de déféripone (DFP) contrecarre cette mortalité ce qui démontre le rôle primordial du fer.

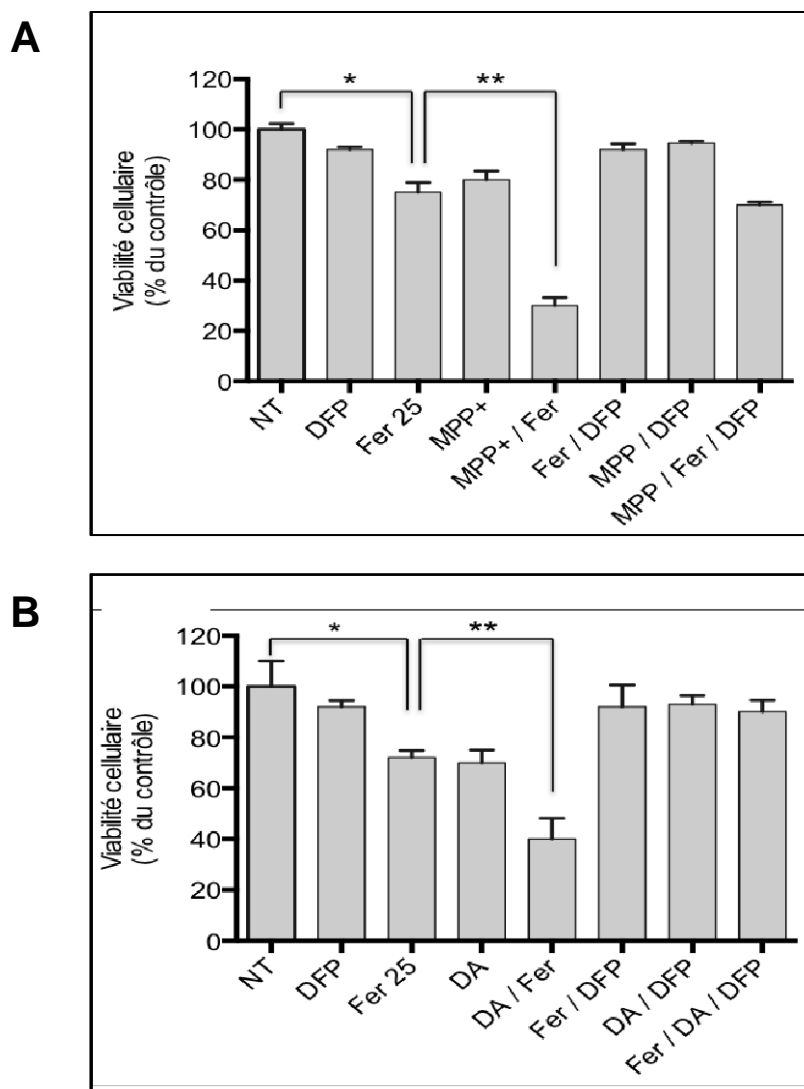
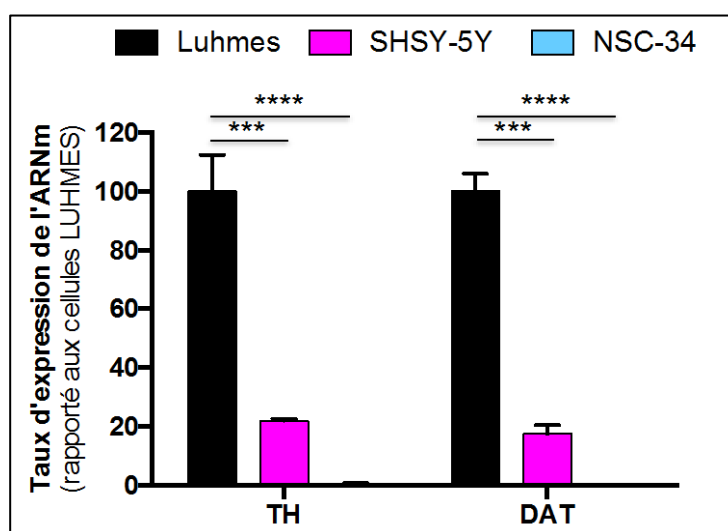


Figure 21 : Effet du fer et du chélateur, la déféripone (DFP) en condition "normale" et en condition de stress oxydant induit par le MPP (A) et par la dopamine (B) sur les cellules LUHMES. \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ;  $n=4$

## 2. Discussion

Il existe une multitude de modèles neuronaux pour étudier la MP. Parmi ces modèles, les cellules LUHMES affichent un taux de conversion en neurones post-mitotiques extrêmement élevé (> 99%). Ces cellules expriment des marqueurs dopaminergiques, présentent des neurites et des propriétés électrophysiologiques. La robustesse de leur état neuronal a été largement étudiée (Schildknecht et al., 2013) et leur origine humaine rend les cellules LUHMES très intéressantes pour l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires liés à la MP.

L'ensemble de nos résultats sur ces cellules montre qu'elles sont les plus sensibles aux effets du fer. Ceci n'est pas étonnant car les LUHMES sont productrices de dopamine (**Figure 22**) et il a été montré que le métabolisme oxydatif de la dopamine augmente la production des ROS (production encore accrue par le fer et notamment par la réaction de Fenton). De plus, les neurones dopaminergiques sont d'autant plus susceptibles au stress oxydatif qu'ils sont riches en mitochondries et qu'ils contiennent une grande quantité de fer. Tous ces éléments font des cellules LUHMES, un type cellulaire particulièrement adapté à l'étude des différentes formes de mort cellulaire induite par le fer mais également des moyens de la contrer à l'aide de chélateurs de fer.



**Figure 22 : Comparaison des taux d'expression des ARNm de TH et de DAT mesurés par RT-PCR sur les cellules LUHMES, SHSY-5Y et NSC-34.**

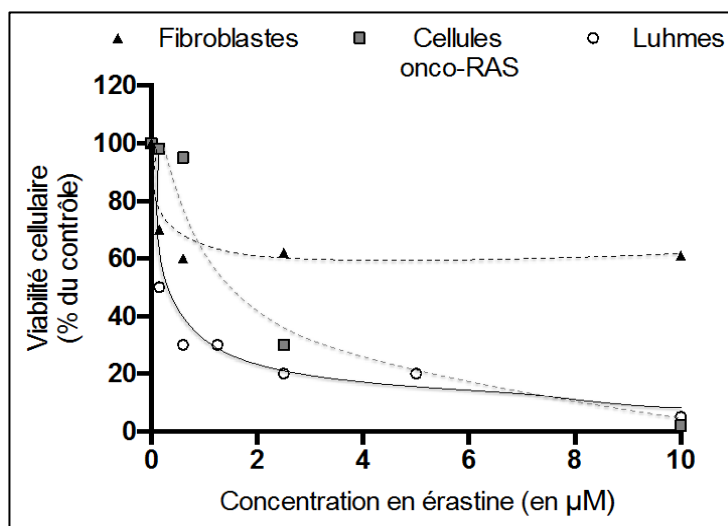
\*\*\* $p < 0,001$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  ;  $n=6$

## II. Etude de l'implication de la ferroptose sur la lignée neuronale dopaminergiques (LUHMES)

### 1. La ferroptose dans les cellules LUHMES

#### A. Comparaison de l'effet de l'érastine par rapport aux cellules cancéreuses

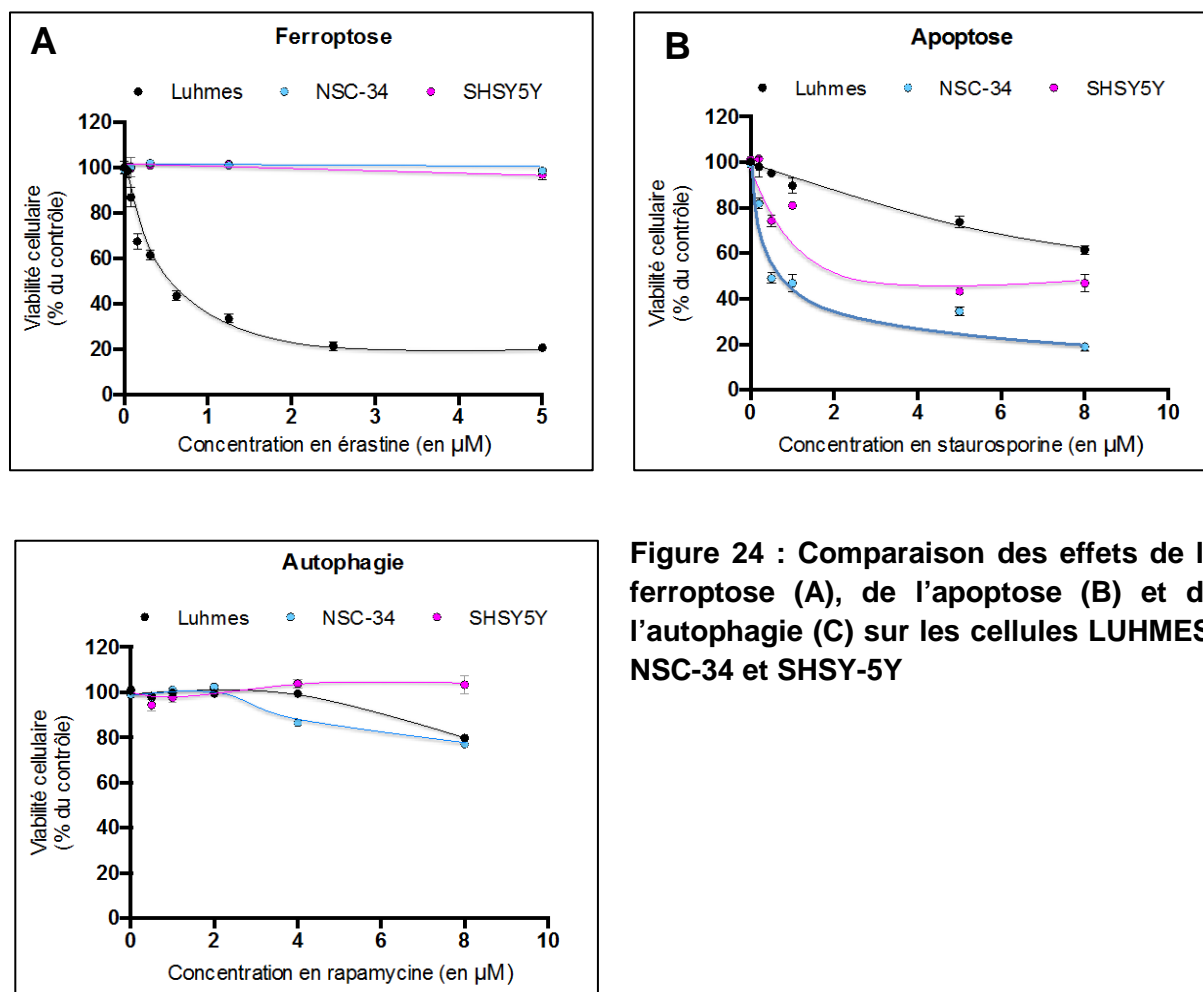
En s'appuyant sur le travail de Dixon et *al.*, la même gamme de concentration d'érastine sur les cellules LUHMES a été réalisé afin de comparer les résultats obtenus avec ceux obtenus par Dixon sur des fibroblastes "wild-type" et sur des fibroblastes ayant une mutation du gène RAS. D'après la **figure 23**, il apparaît clairement que les LUHMES ont un profil similaire aux cellules possédant l'oncogène RAS muté montrant ainsi l'extrême sensibilité de ces cellules envers l'érastine.



**Figure 23 : Comparaison de l'effet de l'érastine sur la viabilité, mesurée par cytométrie de flux, des fibroblastes, des cellules oncogéniques RAS et les cellules LUHMES**

### **B. Comparaison de différentes formes de mort cellulaires sur les cellules LUHMES, SHSY-5Y et NSC-34**

Pour montrer l'implication de la ferroptose dans les cellules dopaminergiques, cette nouvelle forme de mort cellulaire, induite par l'érastine, est comparée à deux autres morts bien connues que sont l'autophagie et l'apoptose, induites respectivement par la rapamycine et la staurosporine (STS). Ces expérimentations ont été faites parallèlement sur les LUHMES, les SHSY-5Y et les NSC-34, la viabilité cellulaire a été mesurée par cytométrie de flux. Les résultats obtenus montrent clairement que la mort induite par l'érastine est beaucoup plus efficace sur les cellules dopaminergiques que sur les autres types cellulaires (**Figure 24A**), à l'inverse, les NSC-34 ou les SHSY-5Y sont beaucoup plus sensibles à l'apoptose (**Figure 24B**). Enfin ces trois types cellulaires ne semblent pas être très sensibles à l'autophagie (**Figure 24C**).



**Figure 24 : Comparaison des effets de la ferroptose (A), de l'apoptose (B) et de l'autophagie (C) sur les cellules LUHMES, NSC-34 et SHSY-5Y**

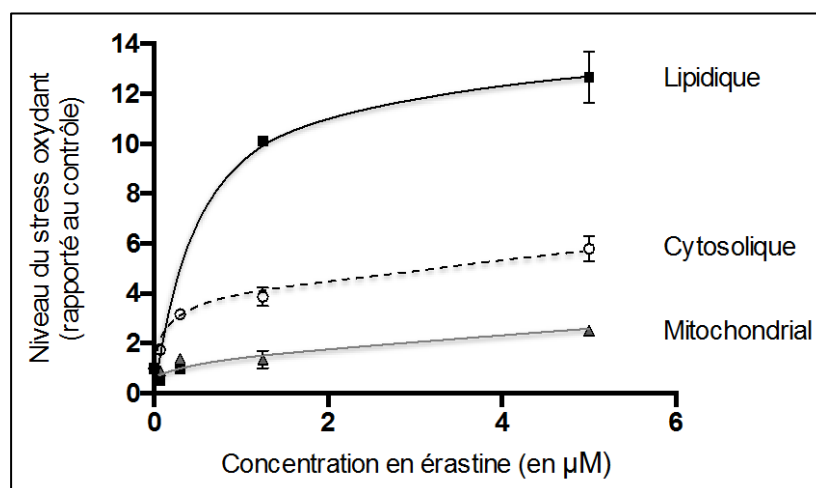
### C. Effet sur le stress oxydant

#### i. Effet de l'érastine sur différents types de stress oxydant

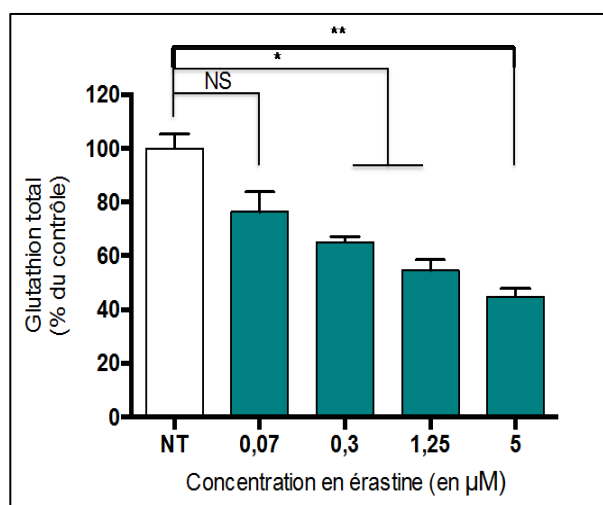
Par cytométrie de flux, nous avons pu mesurer les stress oxydants cytosolique, lipidique et mitochondrial induit par l'érastine sur les cellules LUHMES. Comme le montre la **figure 25**, l'érastine induit un très fort stress lipidique puisqu'à la plus forte concentration, le stress lipidique est 12 fois plus élevé par rapport au contrôle. L'augmentation du stress cytosolique est plus modérée même si elle atteint un niveau 5 fois plus élevé à la plus forte concentration d'érastine. En revanche, le stress mitochondrial ne semble pas être affecté par l'érastine.

En plus d'une augmentation du stress oxydant lipidique, l'érastine induit une diminution des défenses anti-oxydantes et notamment une diminution progressive du pool de glutathion en fonction de sa concentration pour atteindre une réduction de moitié à la plus forte concentration (**figure 26**).

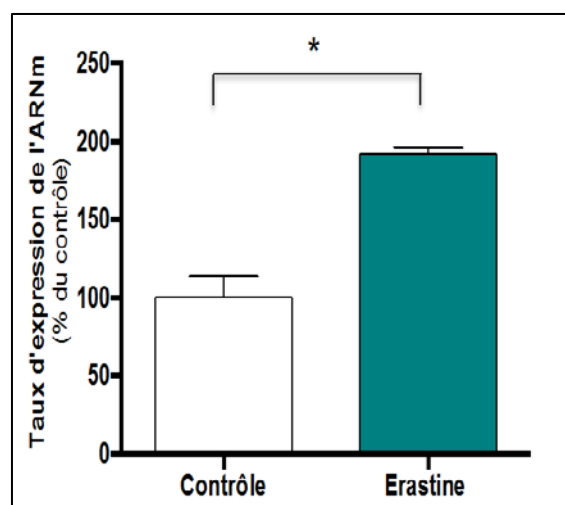
L'érastine agissant sur la peroxydation lipidique et le pool de GSH, la glutathione peroxydase 4 (GPx4) est considéré comme le premier marqueur de la ferroptose, l'érastine up-régulant les taux de Gpx4. Dans les cellules LUHMES, l'érastine engendre une augmentation significative d'un facteur 2 de l'expression de GPx4 (**Figure 27**).



**Figure 25 : Mesure, par cytométrie de flux, des stress oxydants lipidique, cytosolique et mitochondrial induit par l'érastine**



**Figure 26 : Dosage du glutathion total dans les cellules LUHMES après traitement avec une gamme d'érastine.** NS, non significatif ; \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ;  $n = 3$



**Figure 27 : Mesure de l'expression génique de GPx4 dans les cellules LUHMES sans et avec traitement à l'érastine (1,25µM).** \* $p < 0,05$  ;  $n = 6$

ii. Effet de l'érastine en condition de stress oxydant induit par la dopamine

Pour tester les effets de l'érastine en condition de stress oxydant accrue comme c'est le cas dans une maladie neurodégénérative, les cellules LUHMES ont été traitées, pendant 24 heures, avec une petite dose de dopamine (0,2 $\mu$ M) afin d'augmenter d'un facteur 2 leur stress oxydant basal. Sur la **figure 28A**, nous pouvons voir que l'érastine est encore plus efficace en condition de « stress oxydant » induit par la dopamine. L'augmentation de l'effet de l'érastine se répercute également sur le stress lipidique car si en condition « normale » il est 12 fois plus élevé, ce stress lipidique est 20 fois plus élevé en condition oxydante à la plus forte concentration (**figure 28B**).

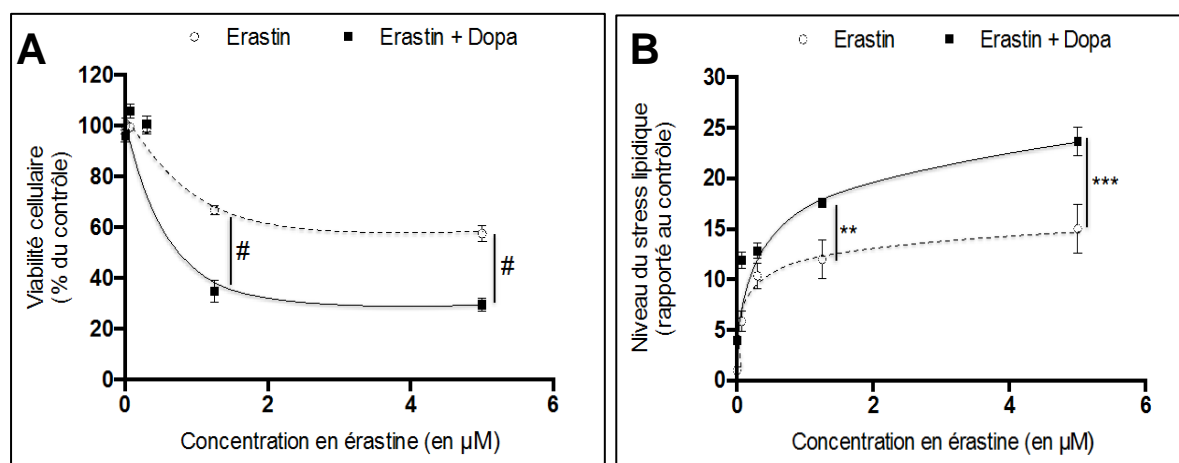


Figure 28 : Effet de l'érastine en condition "normale" et en condition de stress oxydant induit par une dose de dopamine (0,2  $\mu$ M). \*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; #p<0,0001; n=3

## 2. Mesure des cibles de l'érastine sur les cellules LUHMES et sur des prélèvements de patients

### A. Mesure des VDAC sur les cellules LUHMES

Les VDAC ont été décrits comme étant des cibles de l'érastine. Par RT-PCR quantitative, nous avons mesuré les trois isoformes de VDAC dans les cellules LUHMES. L'analyse fine des résultats montrent que les cellules dopaminergiques, en plus de posséder les cibles de l'érastine, les expriment très fortement. En revanche, comme le montre la **figure 29**, l'érastine ne modifie pas leur expression. De manière plus intéressante, lorsqu'on compare les expressions des VDAC entre eux, on remarque que VDAC 3 est 2500 fois plus exprimés que VDAC 2 et 50 fois plus exprimés que VDAC1 (**figure 30**). Il s'avère que VDAC 3 est la cible physique de l'érastine et son "knock-out" augmente la résistance à cette drogue. Ceci pourrait donc en partie expliquer pourquoi les cellules dopaminergiques sont aussi sensibles à l'érastine.



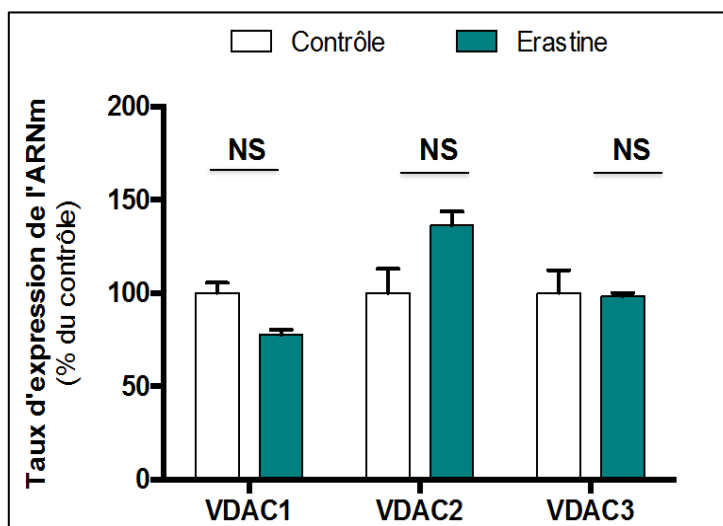


Figure 29 : Expression génique des trois isoformes de VDAC dans les cellules LUHMES sans et avec traitement à l'érastine (1,25µM). NS, non significatif ; n=6

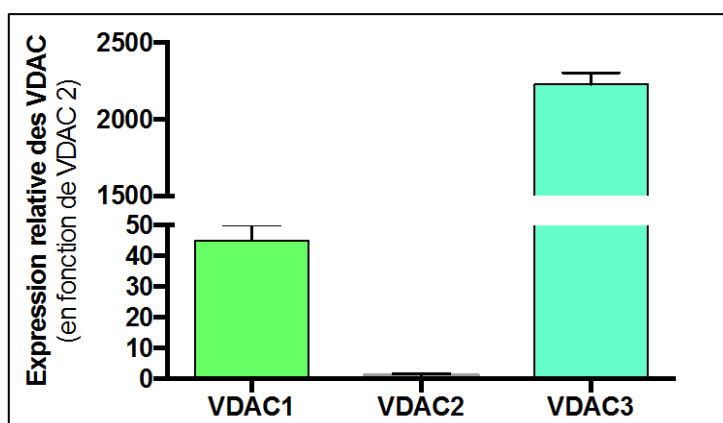
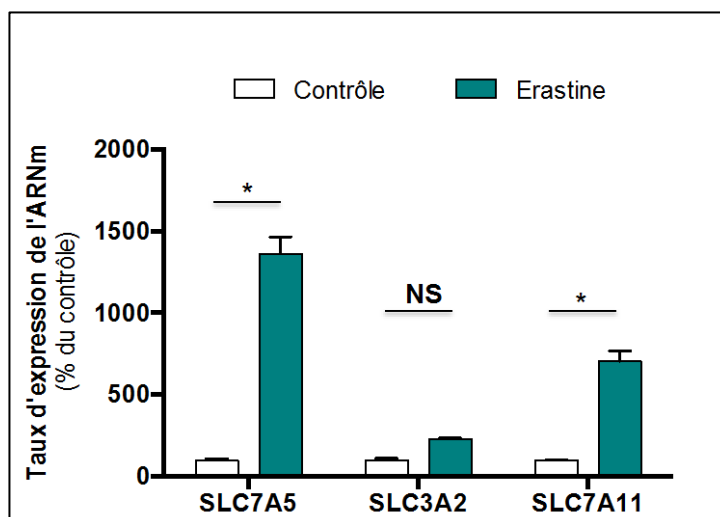


Figure 30 : Expression relative des isoformes de VDAC dans les cellules LUHMES

### B. Mesure des SLC sur les cellules LUHMES

En ce qui concerne les sous unités des systèmes  $Xc^-$  et L, les LUHMES expriment fortement ces cibles, et comme on peut le voir sur la **figure 31**, l'érastine up-régule la sous-unité SLC7A5, sa cible physique, et dans le même temps la sous-unité SLC7A11, qui par ce biais, inhibe le transporteur  $Xc^-$ . Cette up-régulation est en accord avec les travaux de Dixon et *al.*, qui montrait qu'après traitement à l'érastine, la sous-unité SLC7A11 était up-régulée d'un facteur 6 par rapport au contrôle, suggérant ainsi un mécanisme compensatoire à l'inhibition du système  $Xc^-$  par l'érastine.



**Figure 31 : Expression génique des sous-unités des systèmes Xc<sup>-</sup> et L dans les cellules LUHMES sans et avec traitement à l'érastine (1,25  $\mu$ M).** □, non significatif ; \*p<0,05 ; n=6

### 3. Etude de l'inhibition de la ferroptose

Lors de la découverte de la ferroptose, les auteurs ont mentionné plusieurs agents capables de contrer cette forme de mort cellulaire notamment un chélateur de fer, un antioxydant et ont mis en évidence un inhibiteur spécifique de la ferroptose, la ferrostatine-1. Nous avons donc testé les effets de différents agents pharmacologiques sur la viabilité des cellules LUHMES traitées avec une dose unique d'érastine (1,25 $\mu$ M) pendant 24 heures. La **figure 32A** où la viabilité cellulaire est mesurée par cytométrie montre clairement que cette dose d'érastine tue 54% (p<0,0001) des cellules. Un prétraitement d'une heure de ces cellules avec une dose (10mM) d'un antioxydant comme la N-Acétyl-Cystéine (NAC) ou une dose (100 $\mu$ M) d'un chélateur de fer comme la DFP empêchent complètement les effets de l'érastine puisque nous retrouvons une viabilité cellulaire à 100% (p<0,0001). Il en est de même pour les deux inhibiteurs spécifiques de la ferroptose, la ferrostatine-1 (Fer-1, 5 $\mu$ M) et la liproxstatine-1 (Lpx-1, 5 $\mu$ M). En revanche, un inhibiteur spécifique de l'apoptose, le Z-vad (100 $\mu$ M) ou un inhibiteur spécifique de l'autophagie, la chloroquine (CQ, 100 $\mu$ M) n'ont aucun effet sur la mort induite par l'érastine. Nous retrouvons les mêmes résultats lorsque la viabilité est mesurée par le test MTS (**Figure 32B**).

Parallèlement, nous mesurons, par cytométrie, la peroxydation lipidique au sein des cellules. Sur la **figure 33**, nous pouvons observer que la peroxydation lipidique est inversement corrélée à la viabilité cellulaire, ainsi tous les inhibiteurs qui ont protégé des effets de l'érastine ont significativement diminué la peroxydation lipidique dans les cellules LUHMES.

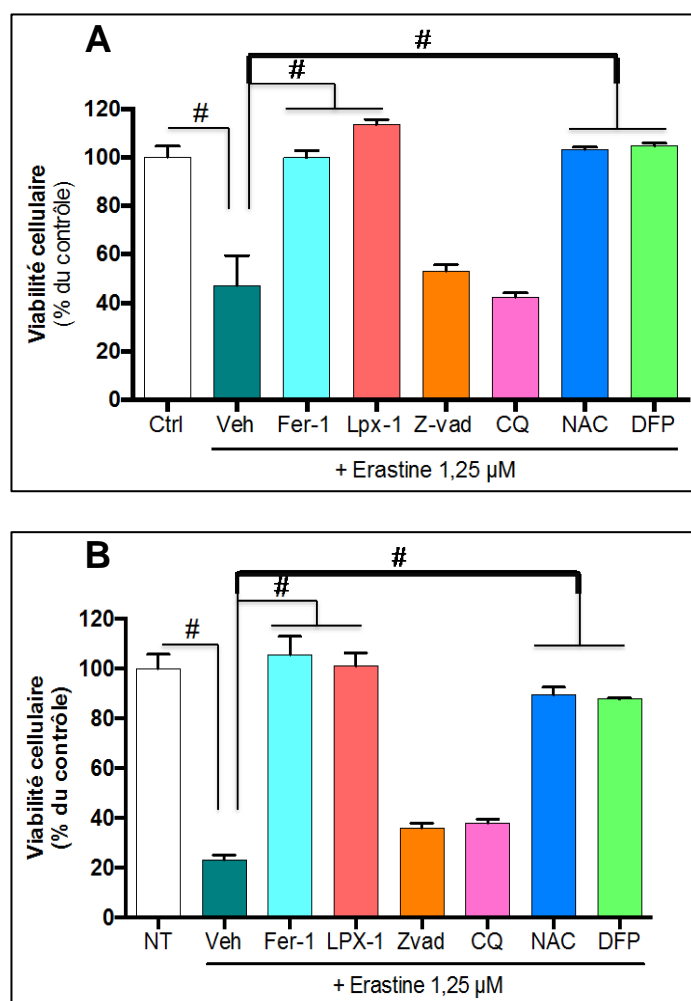


Figure 32 : Effet de différents agents pharmacologiques sur la viabilité des cellules LUHMES mesurée par cytométrie de flux (A) ou par MTS (B) après un traitement de 24 heures avec une dose d'érastine (1,25μM). #p<0,0001 ; n=4

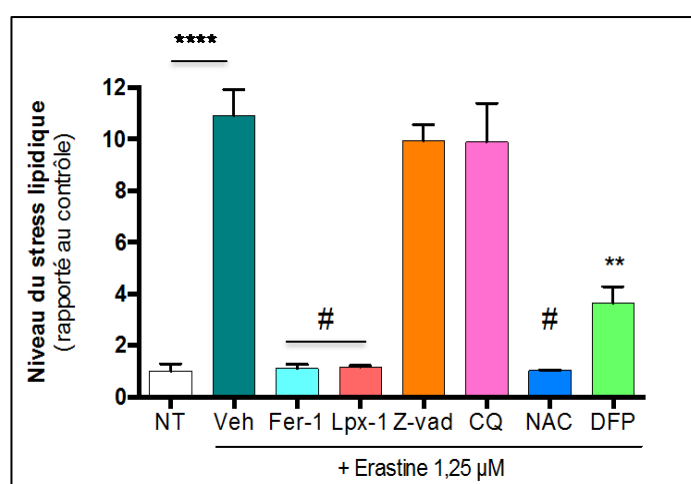


Figure 33 : Effets des inhibiteurs de la ferroptose sur le stress lipidique induit par l'érastine. \*\*p<0,01 ; \*\*\*\* ou #p<0,0001 vs Veh ; n=4

## 4. Le rôle du fer dans la ferroptose

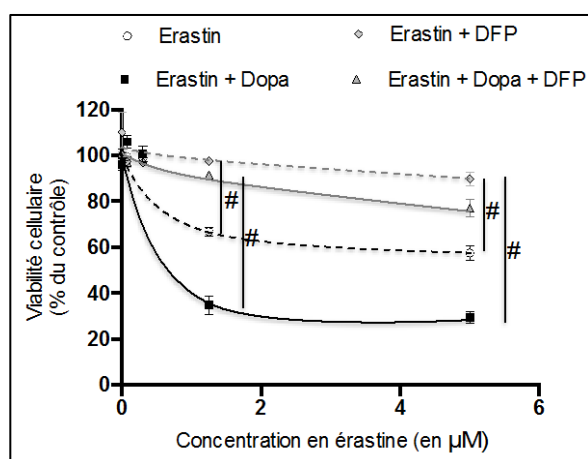
### A. Effet du chélateur de fer sur la ferroptose

Bien que cette forme de mort cellulaire soit dépendante du fer, le rôle direct de celui-ci dans le mécanisme de la ferroptose n'est encore que très peu connu. Pour essayer de comprendre comment le fer pouvait engendrer cette mort cellulaire, plusieurs expérimentations ont été faites en ce sens.

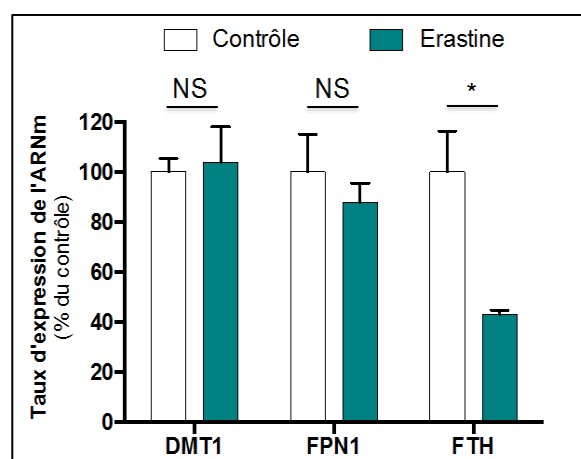
Dans un premier temps, nous avons pu constater le rôle primordial du fer. En effet, un pré-traitement de 4 heures des cellules LUHMES avec un chélateur de fer comme la défériprone (DFP), diminue les effets de l'érastine que se soit en condition normale (+ 30%,  $p < 0,0001$ ) ou en condition oxydante (+50%,  $p < 0,0001$ ) induite par une petite dose de dopamine (0,2 $\mu$ M) (**figure 34**).

### B. Effet de l'érastine sur les transporteurs du fer

Nous avons ensuite mesuré l'expression génique des transporteurs du fer après un traitement à l'érastine. La **figure 35** montre que l'érastine ne modifie pas l'expression de DMT1 ni celle de FPN1. En revanche l'expression du gène de la ferritine, responsable du stockage du fer, est diminuée (-58%,  $p < 0,05$ ) après le traitement d'une dose de 1,5  $\mu$ M d'érastine.



**Figure 34** : Effet du chélateur de fer sur la ferroptose en condition "normale" et en condition de stress oxydant accru par une dose de dopamine. # $p < 0,0001$  ;  $n = 3$



**Figure 35** : Mesure de l'expression génique des transporteurs du fer sans et avec traitement d'une dose d'érastine (1,5 $\mu$ M). \* $p < 0,05$  ;  $n = 6$

### C. Effet de l'érastine sur la concentration en fer dans les cellules LUHMES

Enfin, le fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et le fer total ( $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$ ) intracellulaire a ensuite été dosé dans les cellules LUHMES suite au traitement avec la gamme d'érastine. Dans des cellules non traitées, la concentration en fer total est d'environ 0,5 ng/ $\mu\text{L}$ . Dès les premières doses d'érastine, même si celle-ci n'est pas significative, on observe une tendance à l'augmentation de la concentration en fer dans la cellule. Cette augmentation devient significative à la plus forte concentration d'érastine (5 $\mu\text{M}$ ) pour atteindre une concentration en fer total de 2,54 ng/ $\mu\text{L}$  ( $p < 0,01$ ) soit une concentration 5 fois supérieur au contrôle (Figure 36). En revanche, dans le milieu de culture, aucune différence n'a été observée.

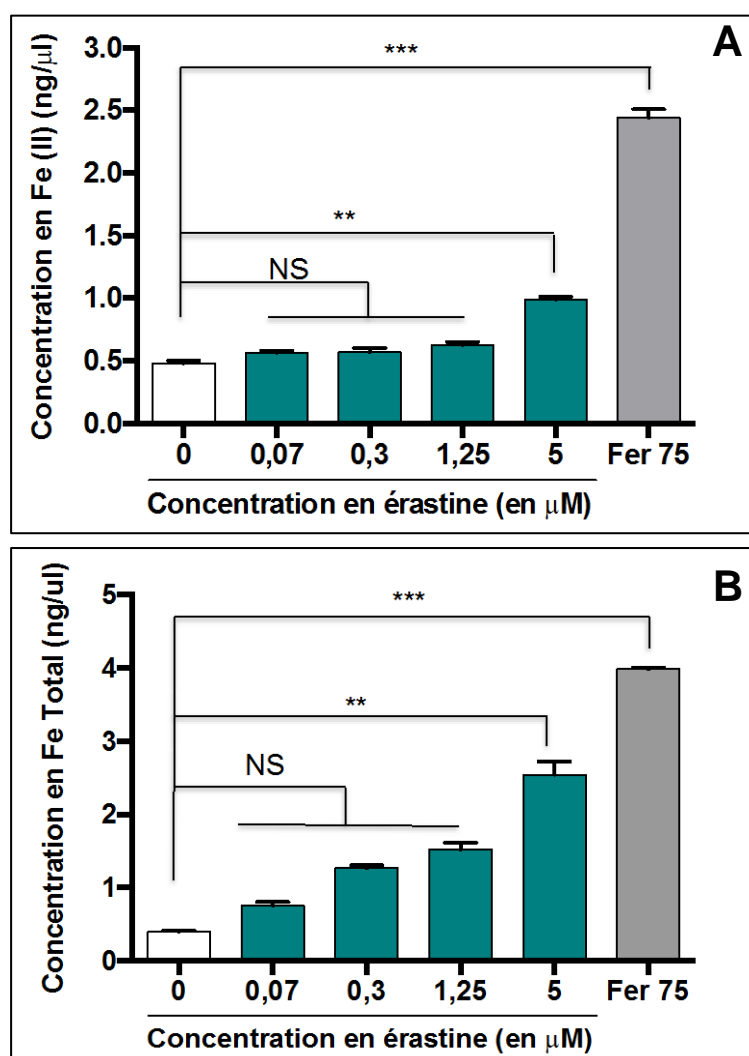


Figure 36 : Dosage du fer ferreux (A) et du fer total (B) intracellulaire sur les LUHMES traitées avec une gamme d'érastine. Contrôle positif (Fer 75  $\square$  M). NS, non significatif ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$  ;  $n=3$

## 5. Induction de la ferroptose par d'autres toxines

### A. Induction de la ferroptose sur les cellules LUHMES par différentes neurotoxines

Nous avons ensuite testé plusieurs drogues, couramment utilisées dans les études sur la maladie de Parkinson pour savoir si elles pouvaient également conduire à une mort par ferroptose. Pour ce faire, nous avons comparé les effets d'un prétraitement avec la ferrostatine-1 (5 $\mu$ M) ou le chélateur de fer (100 $\mu$ M), deux inhibiteurs de la ferroptose, sur un ensemble de toxines. Nous avons également utilisé l'érastine (1,25 $\mu$ M), l'inducteur spécifique de la ferroptose et le BSO (150 $\mu$ M), une toxine capable de dépléter le pool de GSH et d'engendrer une ferroptose.

Les résultats de la **figure 37** montrent de manière tout à fait intéressante que la toxicité du MPP+ (10 $\mu$ M) est complètement contrée par Fer-1 (+70%,  $p < 0,0001$ ) et diminuée par le chélateur de fer (+40%,  $p < 0,0001$ ). La toxicité de la roténone (10 $\mu$ M) et du paraquat (4 $\mu$ M), deux drogues qui agissent également sur le complexe I mitochondrial, est également contrée par le chélateur de fer, mais de façon plus modérée par la ferrostatine-1.

Les effets létaux du N-éthylmaléimide (NEM, 16  $\mu$ M), une drogue agissant sur le pool de GSH, sont significativement diminuées par Fer-1 et par la DFP (+50% et +60%,  $p < 0,0001$ ).

Le glutamate (Glut, 400 $\mu$ M) a été décrit comme pouvant engendrer une ferroptose, ce résultat est retrouvé dans les cellules LUHMES puisque sa toxicité est également atténuée par le chélateur et Fer-1 (+30%,  $p < 0,0001$ ).

Enfin, l'exposition des neurones dopaminergiques à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA, 30 $\mu$ M) et à des fortes concentrations de dopamine (Dopa, 80  $\mu$ M) cause une toxicité par une augmentation du stress cytosolique. Seul le chélateur de fer, diminue très légèrement la toxicité de la 6-OHDA (+13%,  $p < 0,01$ ) mais la sensibilité des cellules LUHMES à la dopamine est diminuée par Fer-1 (+23%,  $p < 0,01$ ) et complètement bloqué par la DFP (+40%,  $p < 0,0001$ ).

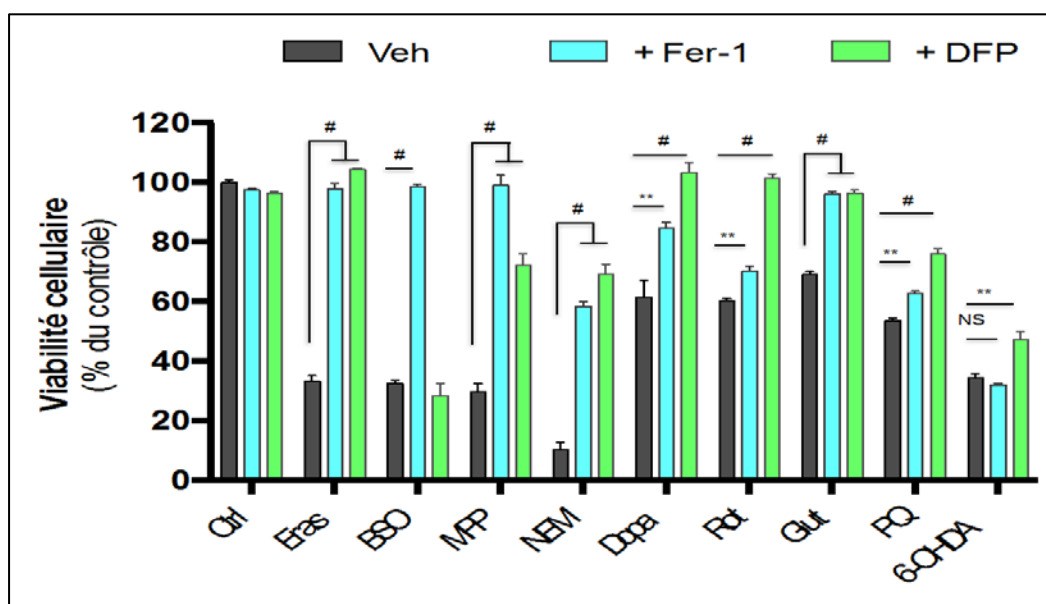


Figure 37 : Effets de Fer-1 et de DFP sur la toxicité de différentes neurotoxines sur les LUHMES. NS, non significatif ; \*\* $p < 0,01$  ; # $p < 0,0001$  ;  $n = 3$

## 6. Discussion

Pendant de nombreuses années, seules deux types de mort cellulaire ont été considérés, l'apoptose décrite comme la mort cellulaire programmée et la nécrose décrite comme une mort accidentelle.

Grâce aux cellules LUHMES, nos travaux démontrent que la ferroptose, une mort cellulaire impliquant le stress oxydant lipidique et le fer intracellulaire, est une voie de mort cellulaire importante pour les neurones dopaminergiques et donc pour la maladie de Parkinson.

Nous avons pu voir que toutes les caractéristiques de la ferroptose découverte jusqu'à présent sont retrouvées dans les cellules LUHMES. La ferroptose peut être empêchée par des antioxydants lipophiles et par des chélateurs du fer, mais pas par des inhibiteurs de l'apoptose, de la nécrose ou de l'autophagie. (Dixon et al, 2012 ; Yagoda et al, 2007 ; Yang et Stockwell, 2008).

L'érastine et ses analogues se lient aux VDACS et à SLC7A5 (Dixon et al, 2012 ; Yagoda et al, 2007). VDACC3 est considéré comme un médiateur important de l'action de l'érastine (Yagoda et al, 2007). Les niveaux d'expression élevés de cette isoforme dans les neurones dopaminergiques peuvent être mis en corrélation avec la sensibilité des LUHMES envers la ferroptose. De manière très intéressante, des études antérieures ont suggéré que les VDACS sont probablement des facteurs associés à la neurodégénérescence dans la MP (Sun et al., 2012; Triplett et al., 2015)

Dixon et al. ont suggéré que la liaison de l'érastine à la sous-unité SLC7A5 en *trans* interfère avec l'absorption de la cystéine par le système Xc- (Dixon et al., 2012). Cela peut conduire à une surexpression transcriptionnelle compensatoire de la sous-unité SLC7A11 (Lo et al., 2008). Ce mécanisme compensatoire a été observé dans les cellules HT-1080 traitées à l'érastine. Dans les cellules LUHMES, nous avons observé une surexpression de SLC7A11 lors d'un traitement des cellules avec l'érastine. De plus, nous avons également observée une surexpression compensatoire de l'ARNm de SLC7A5.

De plus, nos résultats suggèrent que les neurotoxines couramment utilisées dans les modèles de la maladie de Parkinson, dont le MPP+, induit une mort cellulaire par ferroptose dans les cellules LUHMES.

### III. Implication de la ferroptose dans la mort des neurones dopaminergiques des patients parkinsoniens

#### 1. Mesure des cibles de l'érastine sur des prélèvements de patients

Pour montrer l'implication de la ferroptose chez le patient parkinsonien, nous avons mesuré l'expression des 3 isoformes de VDAC et des trois SLC dans 4 régions, le cortex préfrontal (CPF), le cortex occipital (CO), le striatum (STR) et la substance noire (SN) de trois patients sains et trois patients parkinsoniens. Dans ces tissus, j'ai également mesuré l'expression de la Glutathione Peroxidase 4 (GPx4) car elle a été décrite comme un acteur important de la ferroptose. Enfin, pour souligner l'atteinte dopaminergique et nous servant également de contrôle, la TH a été mesurée.

Comme le montre la **figure 38**, toutes les isoformes de VDAC, les trois SLC et GPX4 sont exprimés dans tous les tissus. Dans le cortex préfrontal (**figure 38A**) et le cortex occipital (**Figure 38B**) nous n'observons pas de différences pertinentes et significatives entre les patients parkinsoniens et les patients sains.

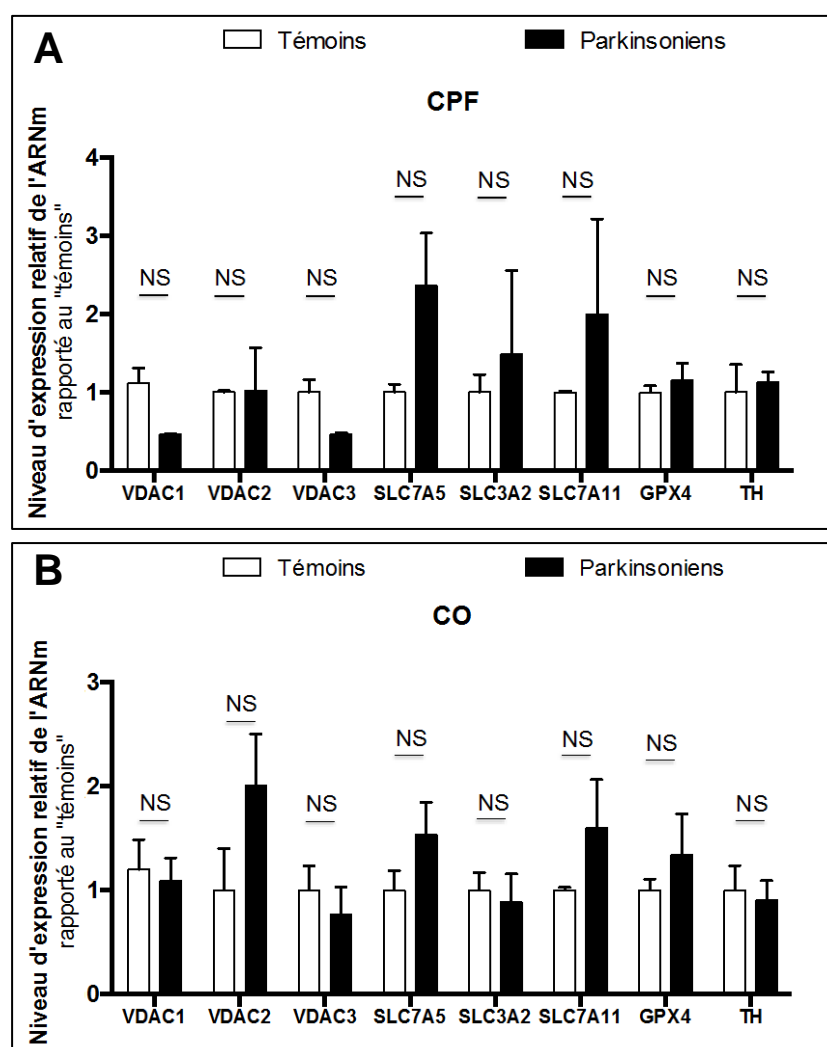
Dans la SN tous les gènes sont également exprimés, mais avec de grandes différences entre les patients sains et parkinsoniens (**figure 39A**). Ceci n'est pas surprenant si l'on considère le niveau de TH comme reflétant l'expression des neurones survivants dans ces échantillons. C'est pourquoi nous avons comparé l'expression de ces 6 gènes par rapport au niveau d'expression de la TH et dans ce cas nous observons que les neurones survivant sur-expriment ces 6 gènes (**figure 39B**).



Dans les échantillons de STR, à la fois pour les patients sains et parkinsoniens, le profil d'expression de ces gènes est plus ou moins la même que dans le SN, avec des différences moins marquées (**figure 39C**).

## 2. Mesure de l'expression de GPx4 sur les prélèvements de patients

En ce qui concerne la GPx 4, la **figure 39** montre que même avec une diminution du nombre de neurones exprimant la TH, une très forte surexpression de GPx4 (7 fois) est observés chez les patients parkinsoniens. Cette surexpression n'est observée que dans la SN.



**Figure 38 : Mesure de l'expression génique des cibles de l'éraстine, de la TH et de GPX4 sur des prélèvements de patients « témoins » et parkinsoniens dans le cortex préfrontal (A) et dans le cortex occipital (B).**

NS, non significatif ; n=3

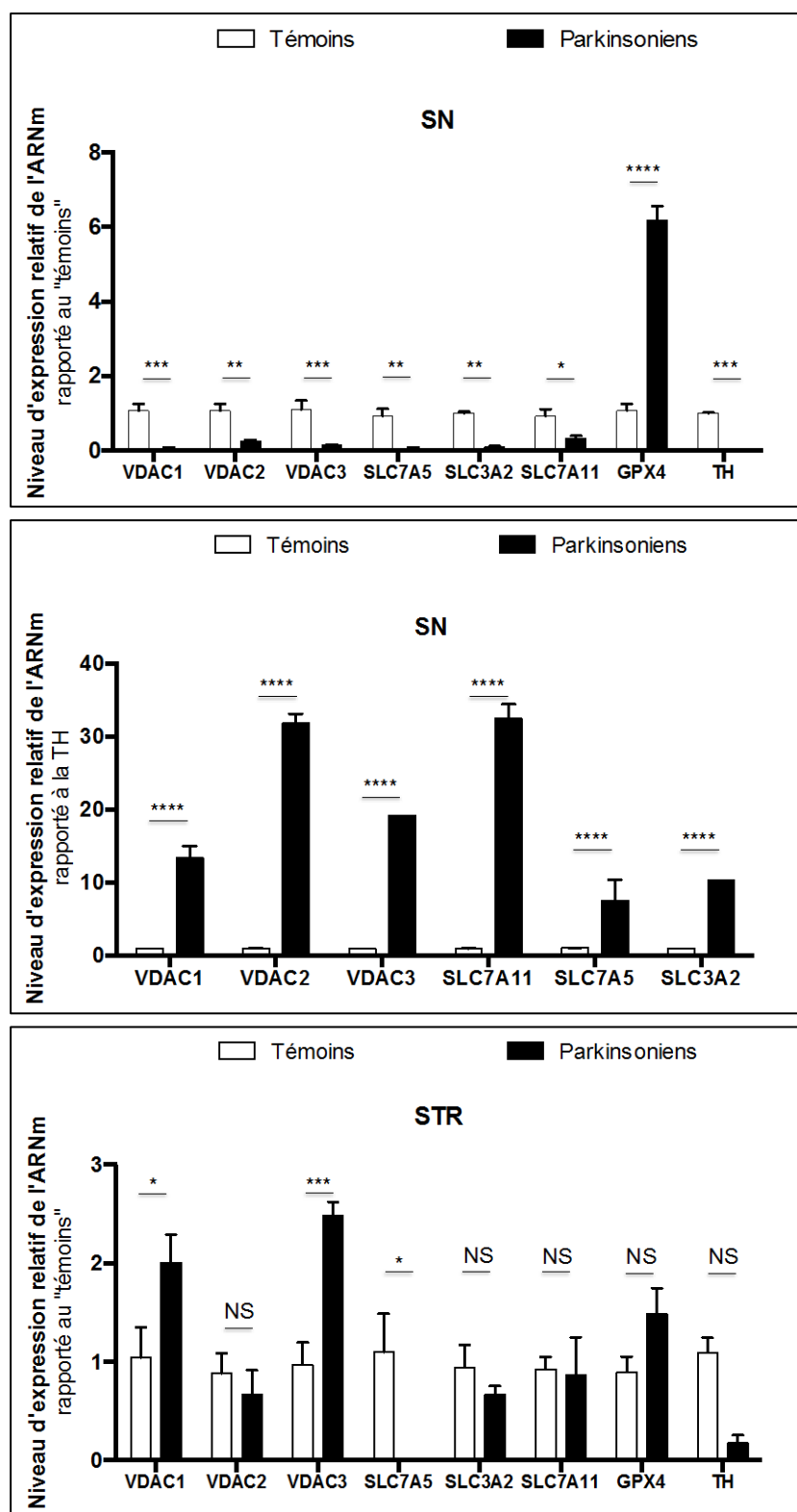


Figure 39 : Mesure de l'expression génique des cibles de l'érastine, de la TH et de GPX4 sur des prélèvements de patients « témoins » et parkinsoniens dans la substance noire (A et B) et dans le striatum (C). NS, non significatif ; \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001 ; n=3

### 3. Discussion

Le caractère précieux du matériel humain dans ce genre d'étude ne nous a pas permis d'approfondir la mécanistique de l'implication de la ferroptose dans ces prélèvements comme nous l'aurions voulu.

Cependant, nos résultats montrent clairement que l'expression des 6 gènes des cibles de l'éraستine, les VDAC et les SLC est surexprimée dans la SN des patients parkinsoniens. La plus grande différence a été observée pour le SLC7A11, qui est en accord avec l'up-régulation compensatoire attendue dans la ferroptose, décrite par Dixon et également retrouvée dans les cellules LUHMES.

Les GPx sont essentielles pour maintenir l'équilibre redox de la cellule (Arthur, 2000) et il a été montré que la GPx4 est impliqué dans la neurodégénérescence (Yoo et al., 2012) et notamment dans la maladie de Parkinson (Blackinton et al., 2009; Zeevalk et al., 2008). Bien que nous puissions constater une très forte diminution des neurones dopaminergiques, nous observons une très forte surexpression de l'ARNm de la GPx4. Ce résultat est pleinement compatible avec l'évaluation du pattern d'expression de GPx4 dans la voie nigro-striée par Bellinger et al. Les auteurs ont rapporté que la GPx4 est co-localisée avec la neuromélanine dans les neurones dopaminergiques de la SN, est exprimée à de faibles niveaux dans le mésencéphale de patients parkinsoniens et est associée à des axones dystrophiques. (Bellinger et al., 2011).

Tous ces résultats suggèrent que (i) GPx4 est up-régulée dans la SN ou que les cellules sur-exprimant la GPX4 survivent plus longtemps et (ii) que la ferroptose est dérégulée dans la maladie de Parkinson.

## IV. Régulation de la ferroptose dans les neurones dopaminergiques

### 1. Effets des inhibiteurs de protéines kinases sur la ferroptose

L'érastine est efficace contre des cellules ayant l'oncogène HRAS muté, cet oncogène est impliqué dans la voie de signalisation RAS/RAF/MEK. Afin de tenter d'identifier des kinases impliquées dans le mécanisme d'action de la ferroptose sur les cellules LUHMES, nous avons décidé de tester des inhibiteurs des voies de signalisation activées par les récepteurs à tyrosine kinase. Le schéma de la **figure 40** montre les inhibiteurs utilisés sur les différentes kinases.

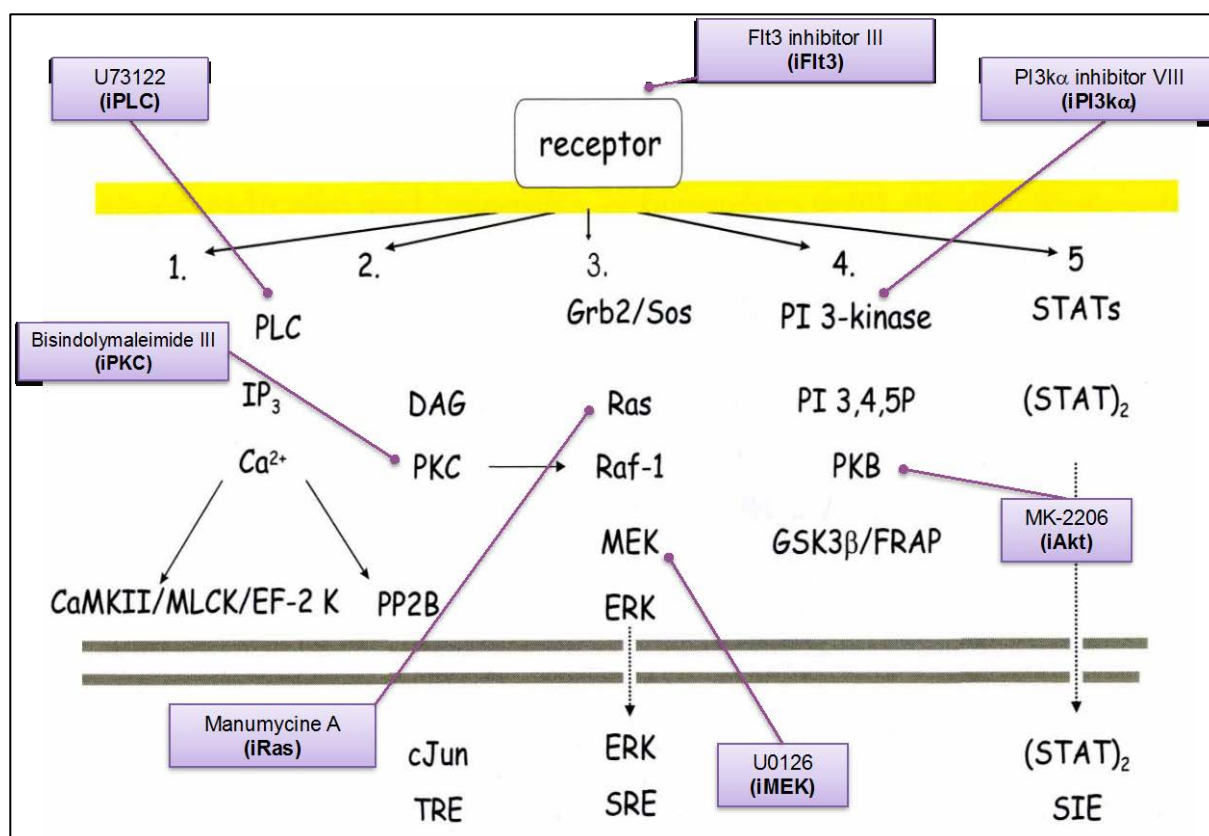


Figure 40 : Schéma des voies de signalisation activées par les récepteurs à tyrosine kinase et des inhibiteurs utilisés pour l'étude.

Des doses-réponses (Figure 41) de tous les inhibiteurs ont été réalisées afin de choisir une dose d'inhibiteur non toxique pour les cellules LUHMES

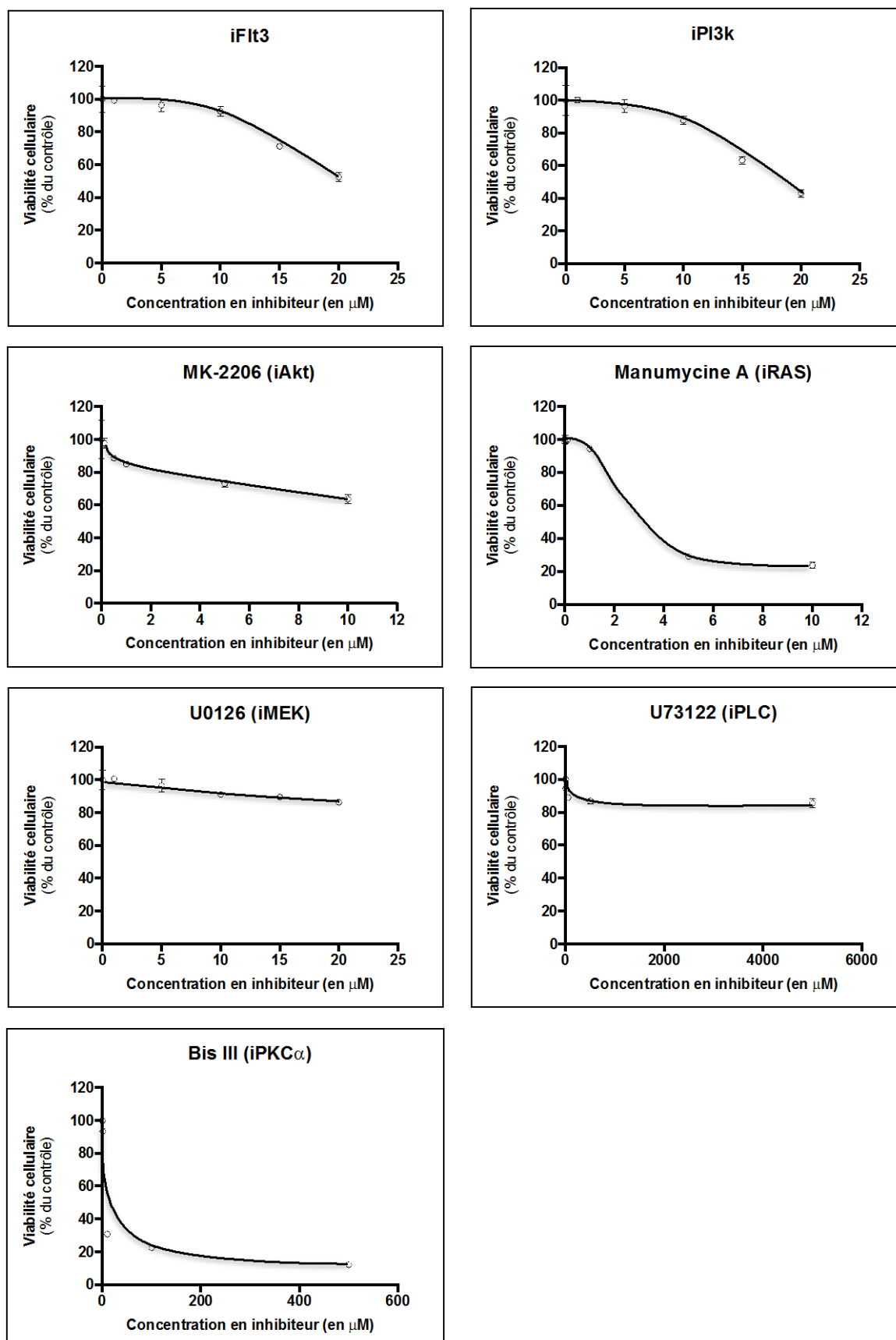
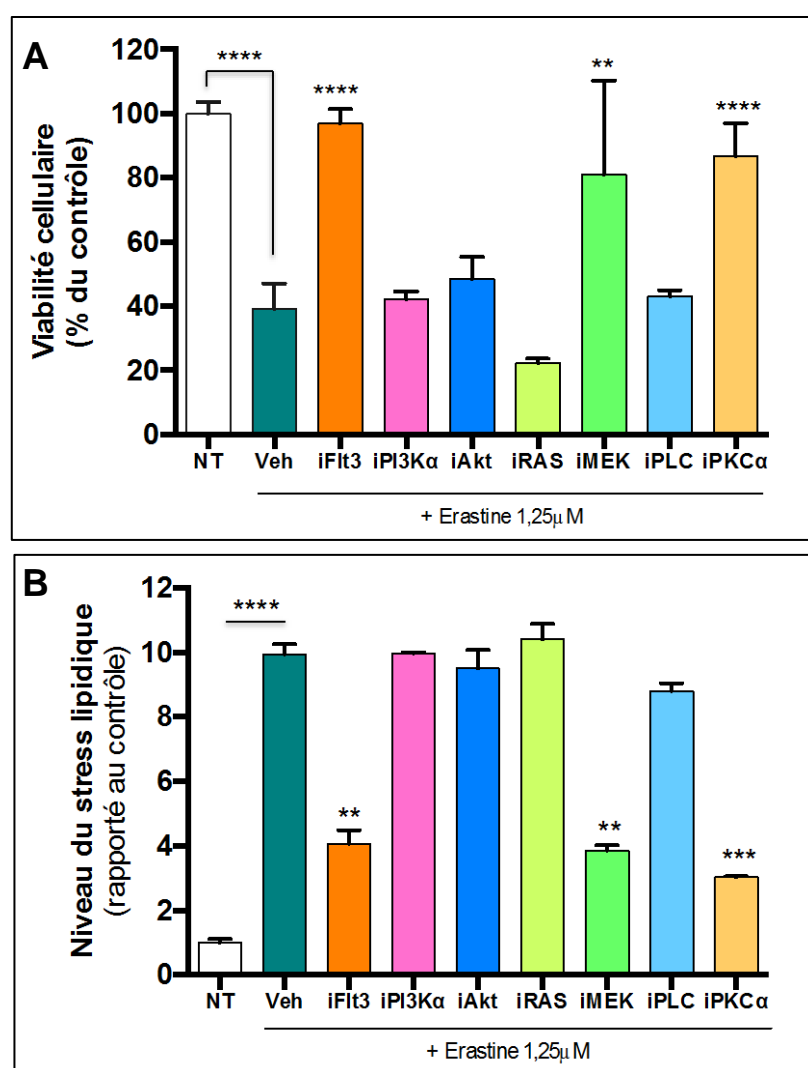


Figure 41 : Dose réponse des différents inhibiteurs de kinases utilisés dans l'étude

La **figure 42A** montre que le prétraitement de 2h avec un inhibiteur de Flt3 $\alpha$  (5 $\mu$ M) ; de MEK (5 $\mu$ M), ou de la PKC $\alpha$  (1 $\mu$ M) inhibe la ferroptose induite par l'érastine (1,25 $\mu$ M). Cette protection est corrélée avec une diminution de la peroxydation lipidique de chacun de ces inhibiteurs (**Figure 42B**). L'inhibition de la ferroptose par un inhibiteur de MEK a été montré dans les premiers travaux de Dixon *et al.*, lors de la découverte de cette forme de mort cellulaire. Flt3 est un récepteur à tyrosine kinase et son action pléiotrope ne peut en faire une potentielle cible thérapeutique efficace. Pour ces différentes raisons, nous avons voulu étudier plus en détail l'influence de la PKC sur la ferroptose.



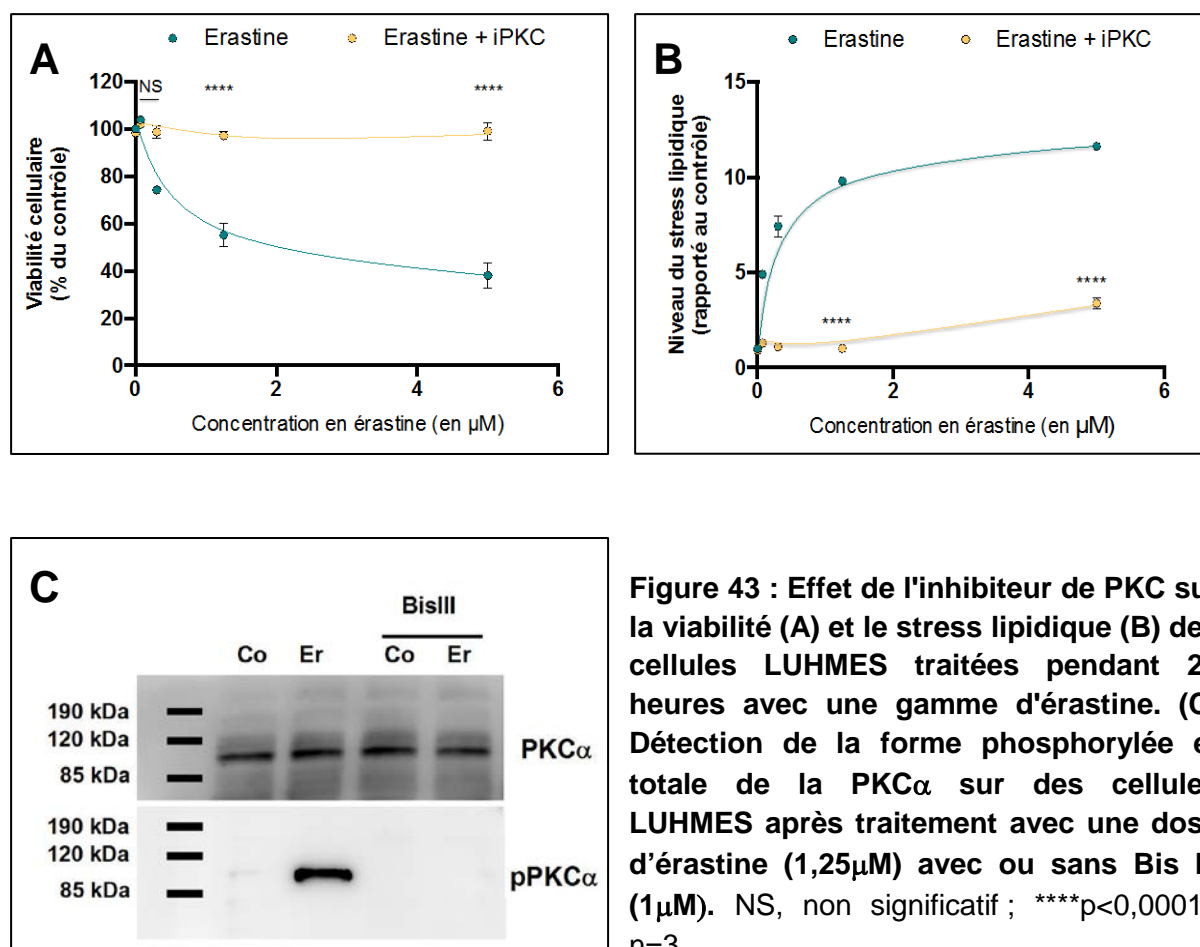
**Figure 42 : Effets des inhibiteurs de kinases sur la viabilité (A) et le stress lipidique (B) des cellules LUHMES traitées avec l'érastine (1,25 $\mu$ M).**

## 2. Effet de l'inhibition de la PKC sur la ferroptose

Le bisindolylmaléimide III, l'inhibiteur de la PKC, protège complètement de la mort induite par l'érastine et cela même au plus forte concentration (**figure 43A**). Cette inhibition de la ferroptose passe par une très forte diminution de la peroxydation lipidique (**figure 43B**).

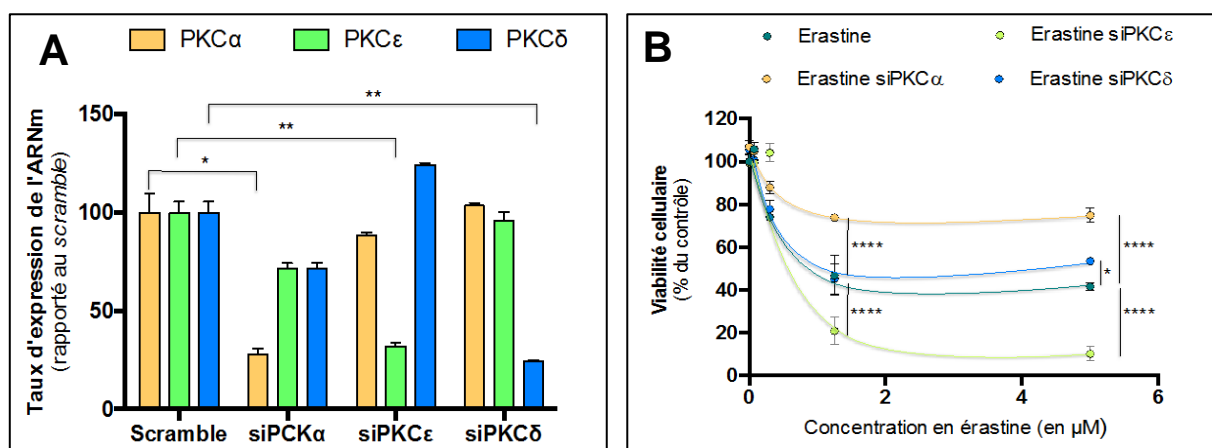
Pour vérifier le rôle de la PKC, un western blot avec des anticorps dirigés contre la forme phosphorylée de la PKC $\alpha$  et contre la PKC totale a été réalisé. La **figure 43C** montre clairement que l'activation de la PKC par l'érastine est totalement inhibée par le Bis III.

Pour confirmer le rôle de la PKC dans le mécanisme d'action de la ferroptose nous avons utilisé des siRNA dirigés contre trois isoformes de la PKC, alpha, delta et epsilon. Après avoir vérifié par RT-PCR que les différents siRNA diminuent effectivement l'expression des gènes (**Figure 44A**), nos résultats montrent que l'inhibition de l'expression de l'isoforme alpha de la PKC est la plus efficace pour contrer la mort cellulaire induite par l'erastine (+40%,  $p < 0,0001$ ). L'isoforme delta ne montre seulement qu'un léger effet positif sur la dose la plus forte (+10%,  $p < 0,05$ ) en revanche l'isoforme epsilon montre des effets plus délétères aux hautes concentrations en érastine (-30%,  $p < 0,0001$ ) (**Figure 44B**).



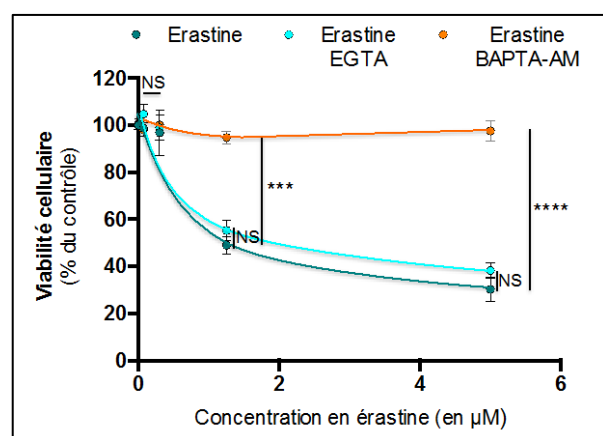
**Figure 43 : Effet de l'inhibiteur de PKC sur la viabilité (A) et le stress lipidique (B) des cellules LUHMES traitées pendant 24 heures avec une gamme d'érastine. (C) Détection de la forme phosphorylée et totale de la PKC $\alpha$  sur des cellules LUHMES après traitement avec une dose d'érastine (1,25 $\mu\text{M}$ ) avec ou sans Bis III (1 $\mu\text{M}$ ). NS, non significatif ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  ;  $n = 3$**

Pour compléter l'investigation sur le mécanisme impliqué dans la protection par la PKC, celle-ci pouvant être activé par le calcium, nous avons testé deux chélateurs calciques, l'EGTA et le BAPTA-AM. La **figure 45** nous montre que seul le BAPTA-AM, dont on est sûr qu'il rentre dans la cellule, montre une protection très efficace contre la ferroptose puisque nous retrouvons une viabilité à 100% ( $p < 0,0001$ ). De plus, l'inhibition de la ferroptose semble également passer par l'inhibition de la phosphorylation de la PKC. En effet, comme le montre le Western-blot de la **figure 46**, tous les inhibiteurs utilisés dans les **figures 32 et 33**, excepté la déféripone, empêchent la phosphorylation de la PKC.

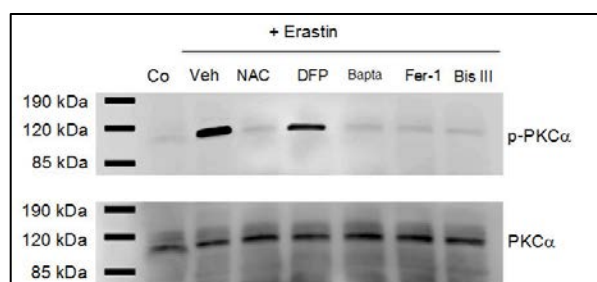


**Figure 44 : Effet de l'inhibition des isoformes de PKC sur la ferroptose. (A) Vérification de la diminution de l'expression génique par les siRNA. (B) Effet sur la viabilité cellulaire des LUHMES traitées avec une gamme d'érastine pendant 24 heures.**

\* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  ;  $n = 3$



**Figure 45 : Effets de l'inhibiteur de PKC, Bis III (1μM) sur la toxicité de différentes neurotoxines sur la viabilité des cellules LUHMES. NS, non significatif ; \*\*\* $p < 0,001$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  ;  $n = 3$**

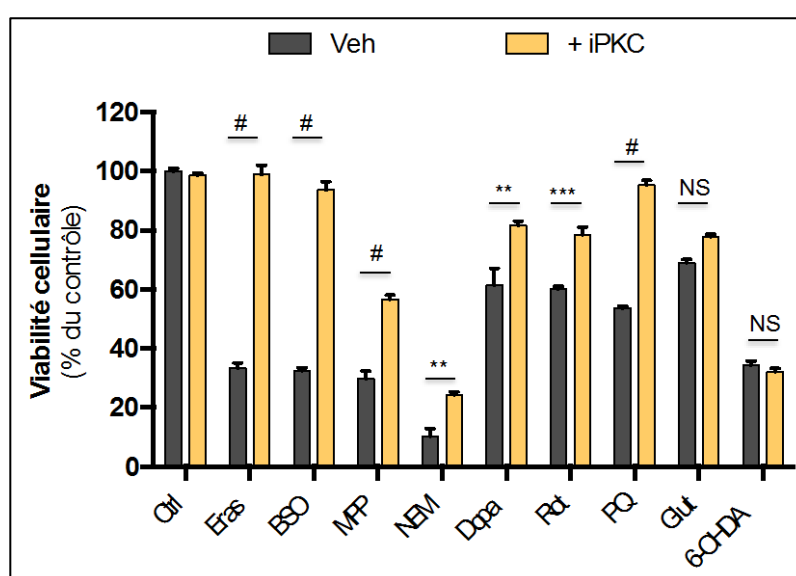


**Figure 46 : Détection de la forme phosphorylée et totale de la PKC par Western-blot après le prétraitement des cellules LUHMES avec les inhibiteurs de la ferroptose**



### 3. Effet de l'inhibiteur de PKC sur la ferroptose induites par différentes toxines

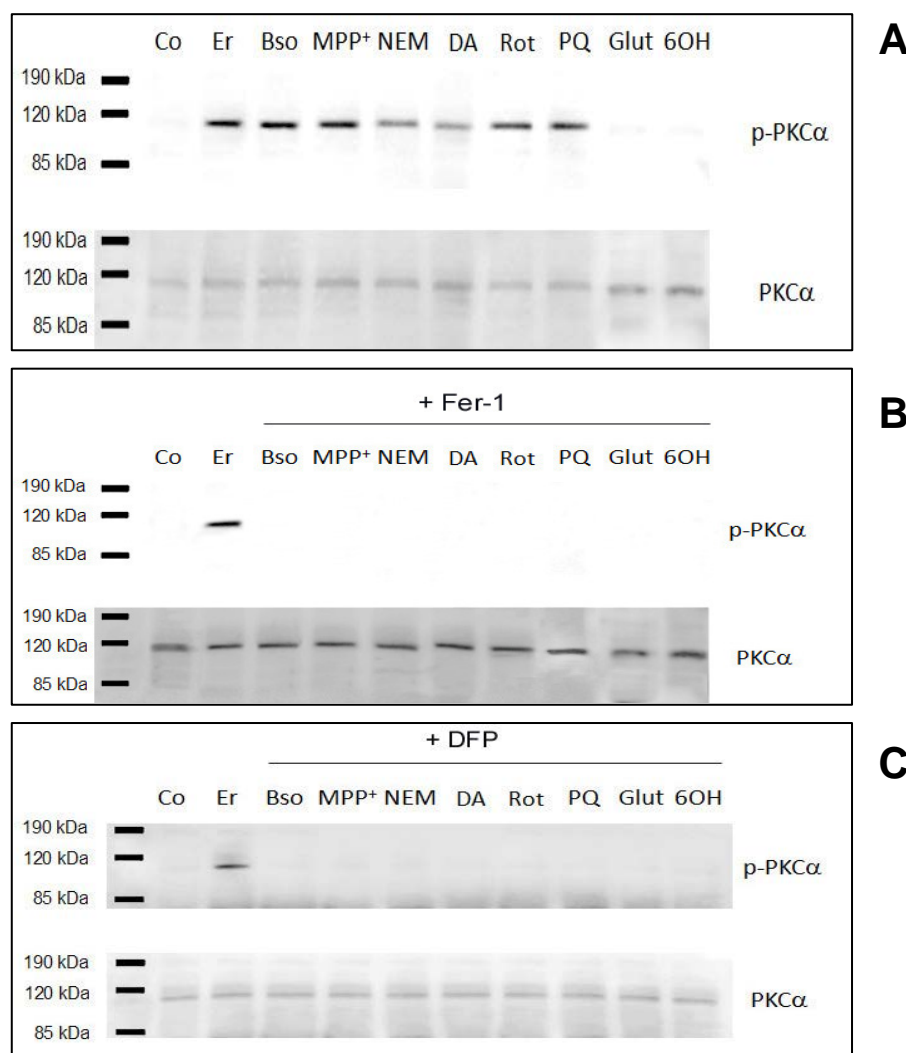
Puisque nous avons montré l'implication de la PKC dans le mécanisme de la ferroptose sur les neurones dopaminergiques, nous avons également testé l'effet de l'inhibiteur de PKC sur toutes ces drogues. La **figure 47** montre qu'excepté pour le glutamate et la 6-OHDA, l'inhibiteur de PKC protège les cellules LUHMES de la toxicité des autres drogues et notamment de celle du MPP+.



**Figure 47 : Effets de l'inhibiteur de PKC, Bis III (1 $\mu$ M) sur la toxicité de différentes neurotoxines sur la viabilité des cellules LUHMES. NS, non significatif ; \*\*\* $p < 0,001$  ; # $p < 0,0001$  ;  $n = 3$**

Ces résultats sont en complète adéquation avec la phosphorylation de la PKC puisque la mesure de cette phosphorylation par western-blot montre que seul le glutamate et la 6-OHDA n'active pas la PKC (**Figure 48A**).

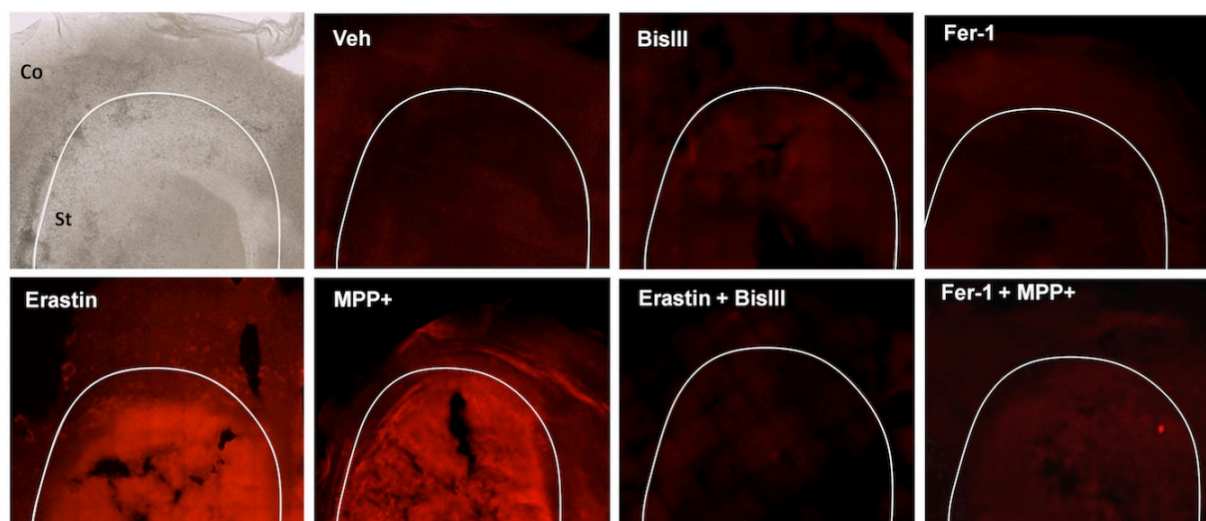
De plus, que se soit pour la ferrostatine-1 (**Figure 48B**) ou pour la déféripone (**Figure 48C**), leur inhibition des différentes neurotoxines passe par l'inhibition de la phosphorylation de la PKC.



**Figure 48 :** Détection de la forme phosphorylée et totale de la PKC sur les cellules LUHMES traitées avec différentes neurotoxines (A) puis avec un prétraitement de Fer-1 (B) et un prétraitement de DFP (C).

#### 4. Effet de l'inhibiteur de PKC sur la ferroptose dans un modèle de culture organotypique

Enfin, pour confirmer l'implication de la PKC dans la ferroptose sur un modèle plus complexe, nous avons utilisé une culture organotypique de striatum, en utilisant l'iodure de propidium comme indicateur de la mort cellulaire dans les terminaisons nerveuses au niveau du striatum. Nos résultats montrent, dans un premier temps, que l'érastine (5 $\mu$ M), tout comme le MPP+ (30 $\mu$ M), engendre une mort cellulaire spécifiquement dans le striatum. La **figure 49** montre également que la mortalité due au MPP+ et à l'érastine est complètement contrecarrée, respectivement, par Fer-1 et par l'inhibiteur de la PKC. Ces résultats confirment à la fois l'implication de la ferroptose dans la mort des cellules dopaminergiques et sa régulation par la PKC obtenus *in vitro*.

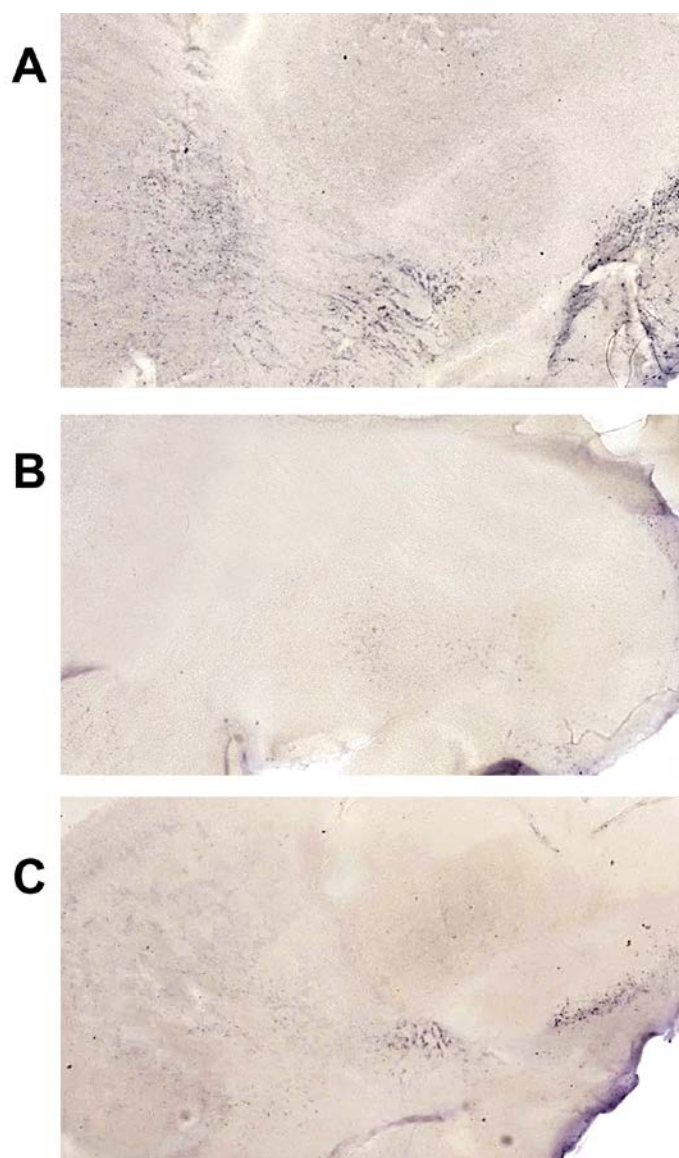


**Figure 49 : Effet de l'inhibiteur de la PKC, Bis III, sur la ferroptose dans un modèle de culture organotypique de striatum.**

Lors de cette étude sur les cultures organotypiques, j'ai également essayé de réaliser une culture de substance noire. Malheureusement, sa petite taille et son extrême sensibilité à l'oxydation a rendu sa culture très difficile.

Dans le cadre d'une brève collaboration avec le laboratoire du Dr. Montero-Menei à Angers, j'ai pu aller apprendre leur technique de coupe, différente de la nôtre, qui consiste à couper le cerveau de raton de façon saggitale de sorte que sur une même tranche, le cortex, le striatum, la voie nigro-striée et la substance noire soient présents. Sur ces tranches, le marquage des neurones dopaminergiques par un anticorps anti-TH montre, très joliment, la voie nigro-striée allant de la substance noire au striatum (**Figure 50A**). Nous pouvons clairement observer que lorsque ces tranches sont traitées avec l'érastine, la totalité de la voie nigro-striée est atteinte puisque nous n'observons plus aucun marquage de cette zone (**Figure 50B**). Ce résultat prouve une fois de plus que l'érastine est capable de tuer spécifiquement les neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée. La ferrostatine-1, quant à elle, est capable de contrer les effets de l'érastine. Ce résultat n'est pas surprenant mais il montre que la ferroptose peut être étudiée dans ce modèle de culture organotypique de la voie nigro-striée.

Par manque de moyen matériel, il a été difficile d'importer la technique de coupe dans notre laboratoire. Un vibratome automatique est nécessaire pour que la coupe soit régulière et utilisable, vibratome que nous ne possédons pas. Notre vibratome manuel demande l'utilisation de beaucoup d'animaux, c'est ce qui explique pourquoi nous n'avons pas réalisé toutes les conditions utilisées dans la figure 49.



**Figure 50 : Coupes organotypiques de la voie nigro-striée non traitée (A), traitées avec l'érastine (5 $\mu$ M, B) et avec la ferrostatine-1 et l'érastine (C).**

## 5. Discussion

L'érastine est efficace contre des cellules ayant l'oncogène HRAS muté, cet oncogène est impliqué dans la voie de signalisation RAS/RAF/MEK. Nous avons donc décidé de tester les inhibiteurs de voies de signalisation clés dans les cellules LUHMES.

L'inhibiteur de Flt3 est capable de protéger les cellules LUHMES de la ferroptose mais ni l'inhibiteur de PI3K ni celui de l'Akt est efficace. Nos résultats sont compatibles avec le rôle connu de PI3K / Akt dans la survie cellulaire. Il est probable que les effets de la voie PI3K / Akt dépendent du contexte cellulaire.

Dans un second temps, on remarque que l'inhibiteur de MEK peut inhiber la ferroptose. L'effet de U0126 et l'implication de la voie de signalisation MEK sont compatibles avec les premiers travaux sur la ferroptose (Dixon et al, 2012 ; Yagoda et al, 2008). En revanche, le traitement avec l'inhibiteur de RAS n'empêche pas les effets de l'érapastine sur la survie des cellules. Cela suggère que, dans les LUHMES, la ferroptose nécessite l'activation de la voie MEK indépendamment de RAS. Cette activation MEK / Ras-indépendante a déjà été signalée, notamment dans les cellules HepG2 (lignée cellulaire d'hépatome humain) et est liée à l'activation de la PKC $\alpha$  (Wen-Sheng, W., 2006).

De façon très intéressante, Bis III, l'inhibiteur de PKC, est capable de protéger les cellules contre la mort cellulaire, même aux doses les plus élevées d'érapastine. Dans les cellules LUHMES, Bis III inhibe efficacement l'activation de la PKC et en utilisant des siRNA spécifiques contre des isoformes de PKC, nous avons confirmé ce résultat et montré que seul le siRNA dirigé contre l'isoforme  $\alpha$  protège efficacement contre la ferroptose.

Grâce à l'utilisation des cultures organotypiques, nous avons pu confirmer à la fois l'implication de la ferroptose dans la mort des cellules dopaminergiques et sa régulation par la PKC.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la toxicité de l'érapastine dans les cellules LUHMES est due à l'activation de la PKC $\alpha$ , qui active à son tour MEK (indépendamment de Ras) pour promouvoir la ferroptose.

Ce lien présumé entre la PKC $\alpha$  et la ferroptose est d'un intérêt particulier, car les changements de PKC ont déjà été décrits dans la pathogenèse de troubles neurologiques (Zhang et Su, 2014). Il est même possible que l'influence de la PKC sur la ferroptose puisse être exercée directement par les cibles de l'érapastine (comme les VDACs). La phosphorylation de VDAC est considérée comme un marqueur de l'équilibre entre survie et mort cellulaire et il a été montré que toutes les isoformes de VDAC peuvent être phosphorylées par des kinases, y compris la PKC (Martel et al., 2014).

La mort cellulaire due à des niveaux élevés de glutamate a été initialement appelée « oxytosis ». Cette mort est caractérisée par des niveaux élevés de ROS et un influx calcique. La mort induite par le glutamate peut également être inhibée par un chélateur de fer. Malgré les similitudes mécanistiques entre la ferroptose et « l'oxytosis », le chélateur de calcium n'a eu aucun effet sur la mort induite par l'érapastine dans les cellules HT-1080 plaçant en doute un rôle pour l'afflux de calcium dans ce processus (Dixon et al, 2012)

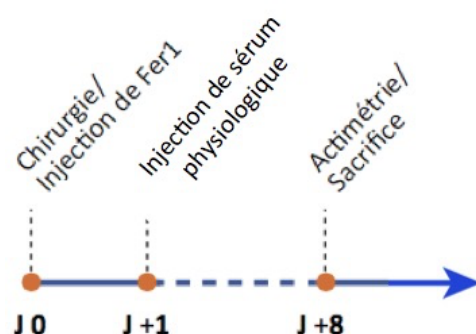
Cependant, dans nos cellules, l'inhibiteur calcique BAPTA inhibe efficacement la mort induite par l'érastine sur les cellules LUHMES.

L'implication de la PKC $\alpha$  et du calcium dans la ferroptose pourraient être une caractéristique spécifique des cellules dopaminergiques, et donc pourrait expliquer certaines des différences observées avec les lignées cellulaires dans lesquelles la ferroptose a été étudié à ce jour.

## V. Implication de la ferroptose dans un modèle animal de la maladie de Parkinson.

### 1. Test de la toxicité de la ferrostatine-1

Dans un premier temps, un test préliminaire de toxicité de la ferrostatine-1 a été réalisé sur un lot de 10 souris. Sans aucune donnée de la littérature sur cette molécule dans notre modèle quant à la dose à utiliser et son éventuel passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE), deux doses de fer-1 ont été choisies à savoir 1mM et 2,5mM que nous avons administré par voie intra-cérébro-ventriculaire (i.c.v). Le lendemain, ces souris sont injectées par voie intra-péritonéale avec du sérum physiologique en suivant le même protocole que celui du MPTP (**Figure 51**). La répartition des animaux s'est faite selon le **tableau IV**. La ferrostatine-1 est injectée par voie intracérébro-ventriculaire (i.c.v).



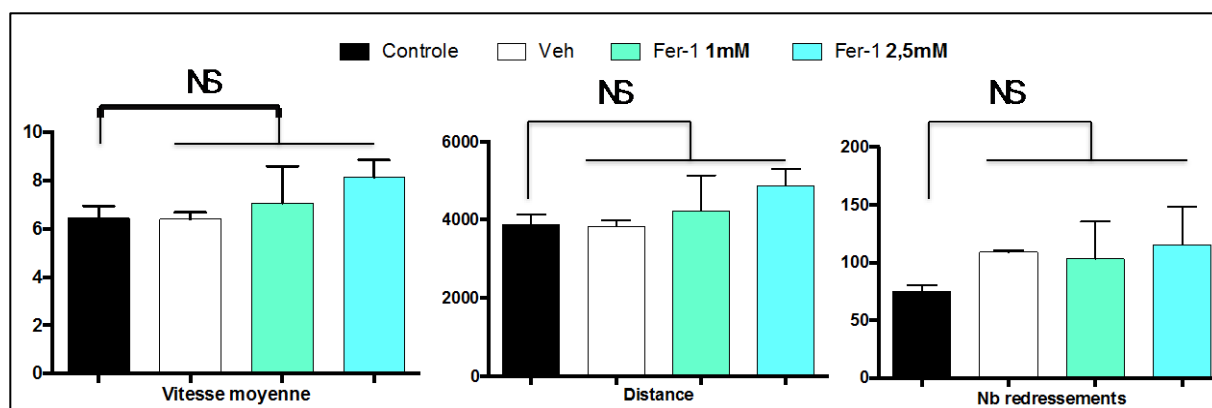
**Figure 51 : Time-line du protocole expérimentale de l'expérience de toxicité de Fer-1**

**Tableau IV : Répartition des effectifs de l'expérience de toxicité de Fer-1**

Groupe	Contrôle PBS	Contrôle éthanol	Fer-1 1mM	Fer-1 2,5mM
Effectif	2	2	3	3

Au bout de 8 jours, l'activité locomotrice des souris a été évaluée par actimétrie afin de vérifier l'innocuité de la ferrostatine-1 sur ces paramètres.

Que se soit au niveau de l'activité locomotrice (**Figure 52**) ou au niveau du nombre de neurones dopaminergiques au sein du striatum et de la substance noire, aucun effet délétère ni du solvant ni de la ferrostatine-1 n'est observé sur nos souris. Ainsi pour l'expérience sur les souris MPTP, le choix de la dose maximale (2,5mM) a été choisie pour maximiser le possible effet neuroprotecteur de la ferrostatine-1.

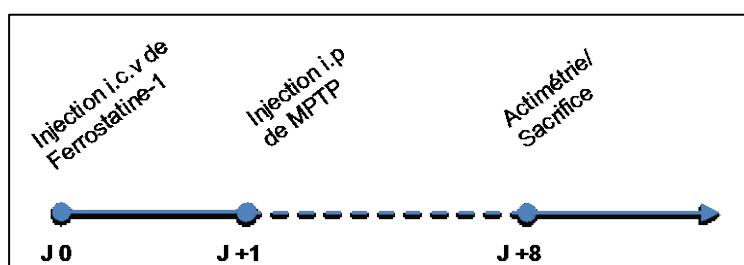


**Figure 52 :** Effet de la ferrostatine-1 sur l'activité locomotrice des souris. NS, non significatif.

## 2. Effet de la ferrostatine-1 sur le modèle MPTP

### A. Schéma du protocole et effectif des groupes

Une fois s'être assuré de l'innocuité de la ferrostatine-1 sur les souris. Nous avons étudié son effet sur les souris MPTP selon le protocole de la **figure 53**.



**Figure 53 :** Time-line du protocole expérimentale de l'expérience préventive avec Fer-1.

L'expérimentation de toxicité nous a également montré que le « contrôle éthanol » n'est pas significativement différent du « contrôle saline ». C'est pourquoi pour cette expérimentation le groupe contrôle sera le groupe éthanol rebaptisé « groupe véhicule (Veh) ». La dose de 2,5mM de ferrostatine-1 équivaut à une dose de 0,2mg/kg injectée en i.c.v. 4 groupes ont donc été créés pour cette expérimentation dont le **tableau V** récapitule les effectifs.

**Tableau V : Répartition des effectifs de l'expérience préventive de Fer-1**

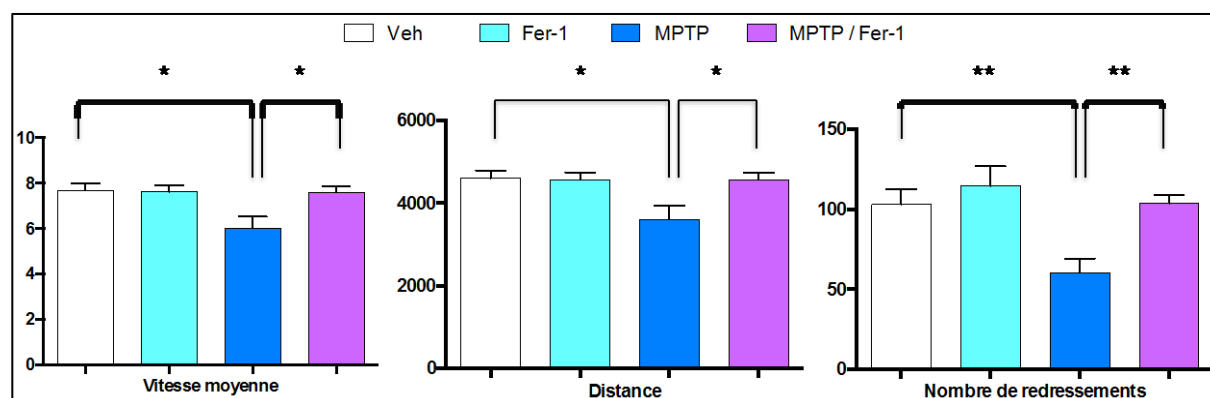
Groupe	Contrôle Ethanol (Veh)	Fer-1 2,5mM	MPTP	MPTP Fer-1 / 2,5mM
Effectif	10	10	11	13

### B. Effet de la ferrostatine-1 sur l'activité locomotrice

Au bout de 8 jours, l'activité locomotrice de toutes les souris est mesurée par actimétrie avant de les sacrifier pour les études d'immunohistochimies. Trois paramètres sont retenus : la vitesse moyenne, la distance parcourue et le nombre de redressements.

Les résultats de la **figure 54** montrent que le MPTP diminue de façon significative la vitesse moyenne ( $6 \pm 1,5\text{cm/s}$ ,  $p < 0,05$ ), la distance parcourue ( $3614 \pm 647\text{cm}$ ,  $p < 0,05$ ) et de façon plus prononcée le nombre de redressements ( $60 \pm 24$ ,  $p < 0,01$ ) qui est le paramètre le plus sensible lors des études avec le modèle MPTP.

Ils montrent également, et surtout, que la ferrostatine-1 est capable de contrer significativement cette diminution puisque nous retrouvons, pour chaque paramètre mesuré par l'actimétrie, des résultats semblables au groupe contrôle. ( $7,5 \pm 0,9\text{cm/s}$ ,  $p < 0,05$ ) pour la vitesse moyenne, ( $4569 \pm 549\text{cm}$ ,  $p < 0,05$ ) pour la distance parcourue et ( $104 \pm 18$ ,  $p < 0,01$ ) pour le nombre de redressements.



**Figure 54 : Effet de la ferrostatine-1 sur l'activité locomotrice des souris. NS, non significatif.**



### C. Effet de la ferrostatine-1 sur les neurones dopaminergiques

Une fois les animaux sacrifiés, une immunohistochimie avec un anticorps dirigés contre la TH est réalisée sur la substance noire et sur le striatum permettant de vérifier l'impact de la ferrostatine-1 sur les neurones dopaminergiques des souris MPTP.

#### *i. Substance Noire*

Dans la substance noire, le marquage de la TH nous permet de compter les neurones dopaminergiques dans cette structure pour mesurer l'impact du MPTP et de la ferrostatine-1. La **figure 55A** montre que le MPTP tue 64% ( $p < 0,01$ ) des neurones dopaminergiques, cette perte dopaminergique est diminuée par la ferrostatine-1 puisque lorsque les souris MPTP sont prétraitées avec Fer-1, la perte dopaminergique n'est que de 15% ce qui représente une neuroprotection de 29% ( $p < 0,0001$ ) par rapport au MPTP. Les images de la **figure 55B** illustrent clairement ces résultats.

#### *ii. Striatum*

Au niveau du striatum, nous pouvons observer l'effet du MPTP et de la ferrostatine-1 sur les fibres dopaminergiques par une méthode semi-quantitative qui consiste à mesurer la densité optique du tissu striatal.

Les souris traitées avec le MPTP présentent, dans le striatum, une perte significative des fibres dopaminergiques (-53%,  $p < 0,0001$ ). La **figure 56** montre également que la ferrostatine-1, injectée en i.c.v, 1 jour avant le MPTP, protège environ 30% ( $p < 0,0001$ ) des fibres dopaminergiques du striatum.

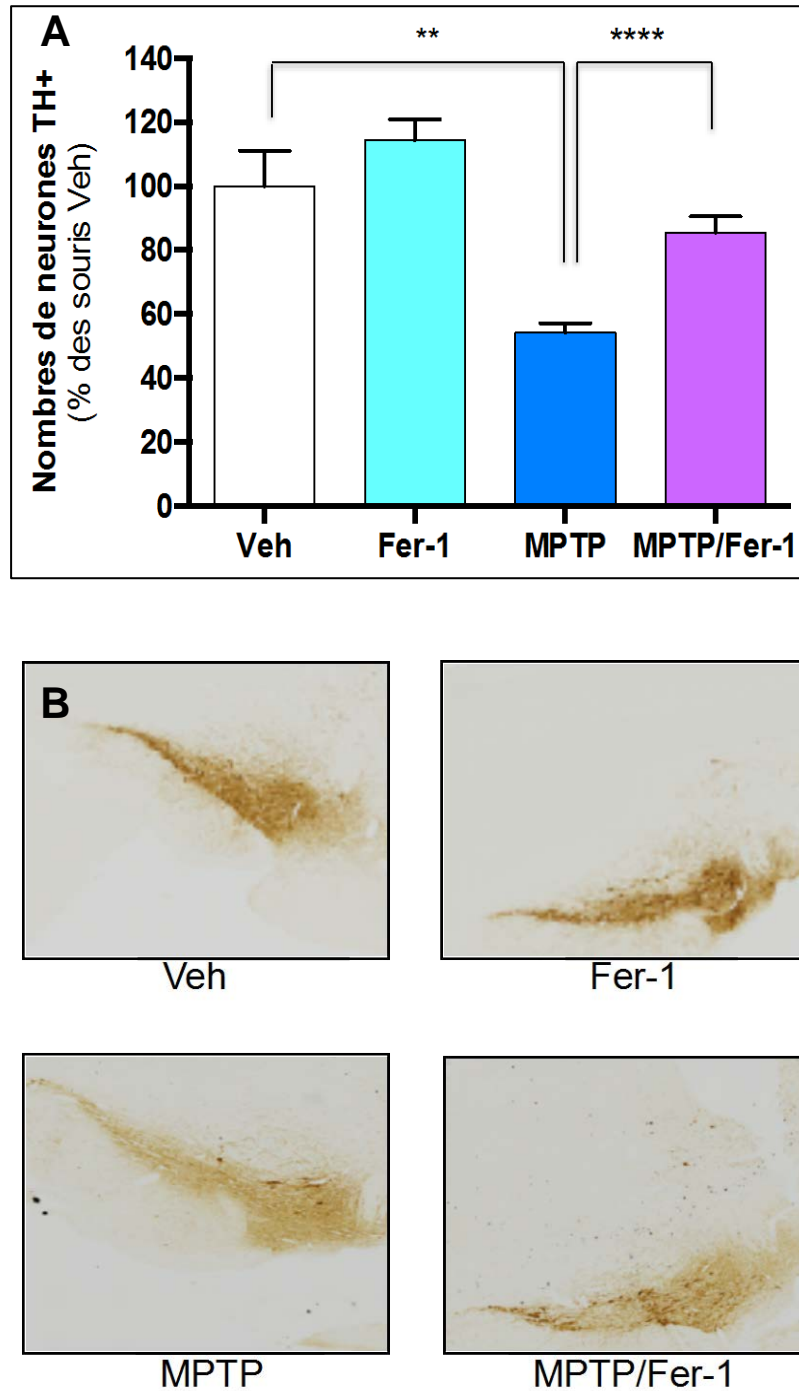


Figure 55 : Effet de la ferrostatine-1 sur les neurones dopaminergiques de la substance noire. (A) Comptage des neurones dopaminergiques de la SN. (B) Image de l'immunomarquage de la TH dans la substance noire. \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$

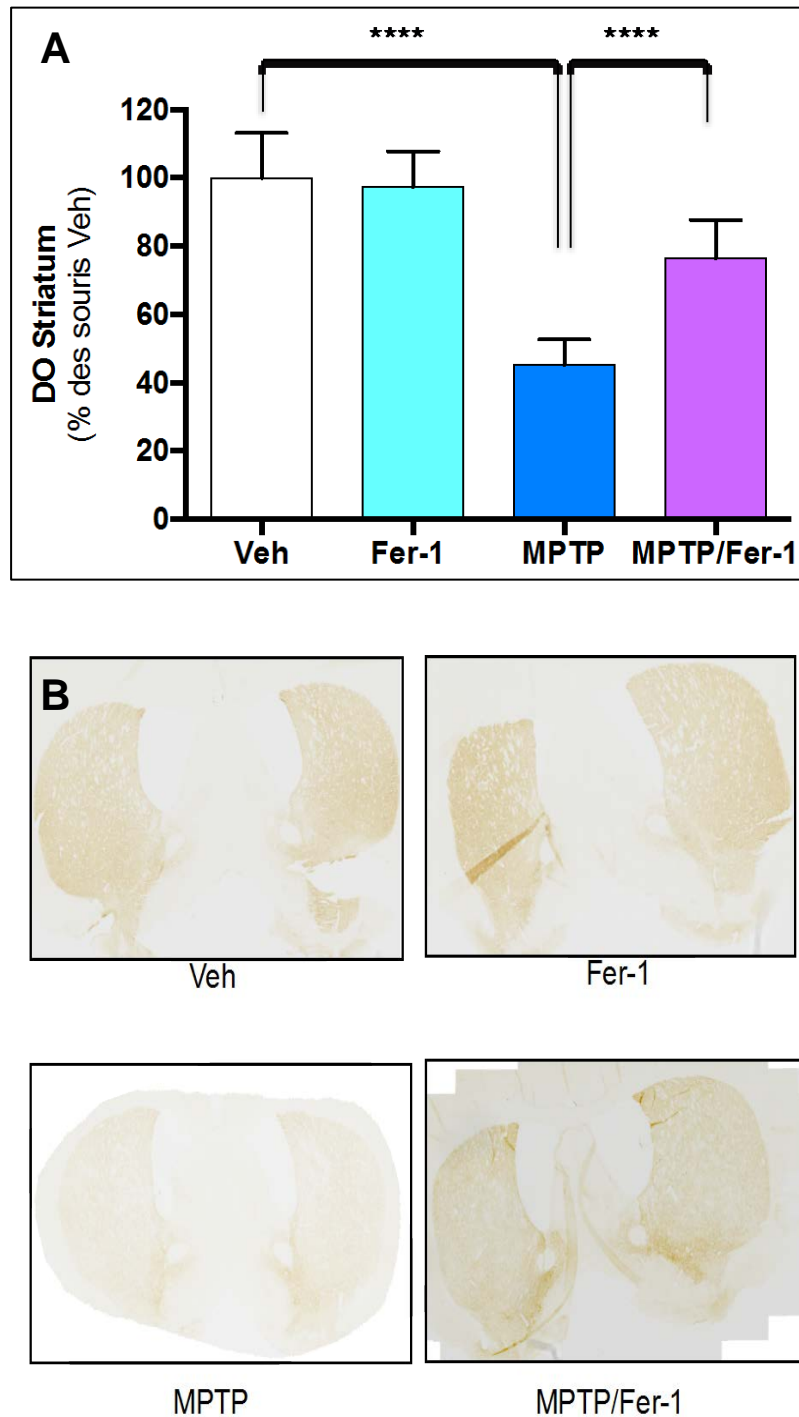
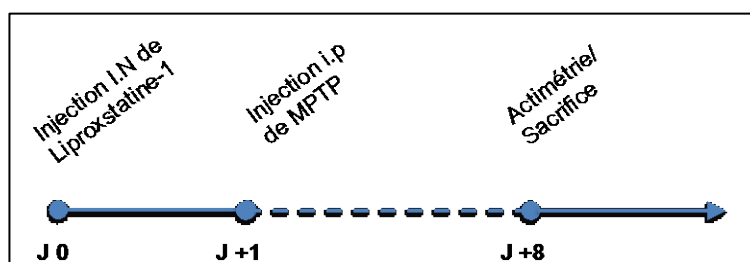


Figure 56 : Effet de la ferrostatine-1 sur les fibres dopaminergiques du striatum. (A) Mesure de la densité optique de la TH dans le striatum. (B) Image de l'immunomarquage de la TH dans le striatum. \*\*\*\* $p < 0,0001$

### 3. Effet de la liproxstatine-1 sur le modèle MPTP

#### A. Schéma du protocole et effectif des groupes

Notre deuxième approche a été d'utiliser la liproxstatine-1, un inhibiteur spécifique de la ferroptose, liposoluble, qui passe la BHE nous permettant ainsi de l'administrer par voie intra-nasale (IN) selon le protocole de la **figure 57**.



**Figure 57 : Time-line du protocole expérimental de l'expérience préventive avec Lpx-1**

Pour cette expérimentation, nous avons créé quatre groupes (Veh ; Lpx-1 ; MPTP ; MPTP/Lpx-1) dont les effectifs sont de 10 souris pour chacun de ces groupes (**tableau VI**). La dose de 2,5 mM de liproxstatine-1 équivaut à une dose de 0,7mg/kg administrée en intra-nasale.

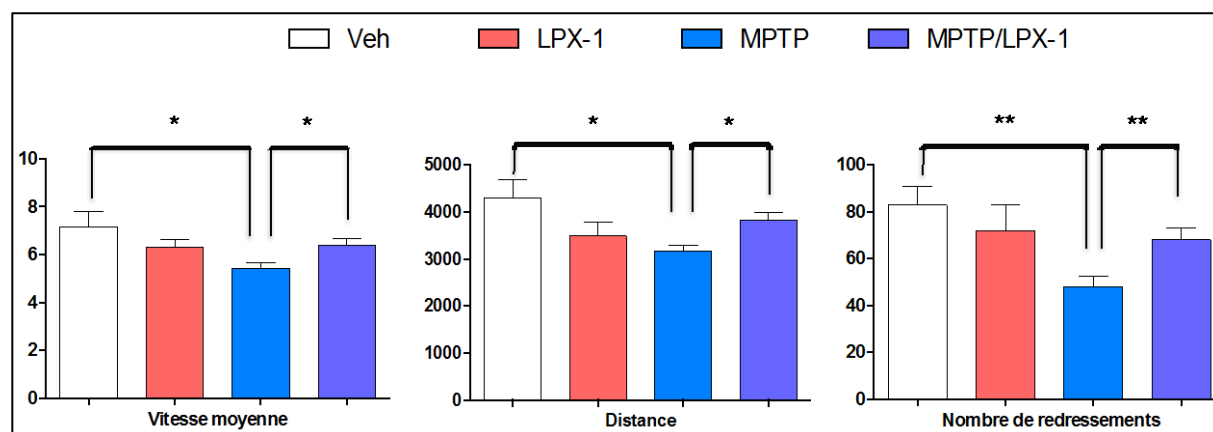
**Tableau VI : Répartition des effectifs pour l'expérimentation avec la liproxstatine-1**

Groupe	Contrôle DMSO1% PBS (Veh)	Lpx-1 2,5mM	MPTP	MPTP / Lpx-1 2,5mM
Effectif	10	10	10	10

#### B. Effet de la liproxstatine-1 sur l'activité locomotrice

Les résultats du test d'actimétrie montrent que le MPTP diminue de façon significative la vitesse moyenne ( $5,4 \pm 0,5\text{cm/s}$ ,  $p < 0,05$ ), la distance parcourue ( $3173 \pm 272\text{cm}$ ,  $p < 0,05$ ) et de façon plus prononcée le nombre de redressements ( $48 \pm 10$ ,  $p < 0,01$ ).

Ils nous permettent également d'observer que la liproxstatine-1 est capable de contrer significativement cette diminution pour chaque paramètre mesuré par l'actimétrie ( $6,4 \pm 0,6\text{cm/s}$ ,  $p < 0,05$ ) pour la vitesse moyenne, ( $3834 \pm 385\text{cm}$ ,  $p < 0,05$ ) pour la distance parcourue et ( $68 \pm 12$ ,  $p < 0,01$ ) pour le nombre de redressements (**Figure 58**).



**Figure 58 : Effet de la liproxstatine-1 sur l'activité locomotrice des souris MPTP.**  
\* $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$  ;  $n = 10$

### C. Effet de la liproxstatine-1 sur les neurones dopaminergiques

#### i. Substance Noire

La **figure 59A** montre que le MPTP tue 34% ( $p < 0,01$ ) des neurones dopaminergiques, cette perte dopaminergique est diminuée par la liproxstatine-1 puisque lorsque les souris MPTP sont prétraitées avec Lpx-1, la perte dopaminergique n'est que de 13% ce qui représente une neuroprotection de 20% ( $p < 0,05$ ) par rapport au MPTP. Une illustration de ces résultats est représentée sur la **figure 59B**

#### ii. Striatum

Ces différences sont plus marquées au niveau du striatum. Le MPTP engendre une perte significative des fibres dopaminergiques (-66%,  $p < 0,001$ ) mais l'injection intranasale de liproxstatine-1 protègent 29% ( $p < 0,01$ ) de ces fibres dans le striatum (**Figure 60A**). Des images de l'immuno-marquage de la TH dans le striatum sont représentées dans la **figure 60B**.

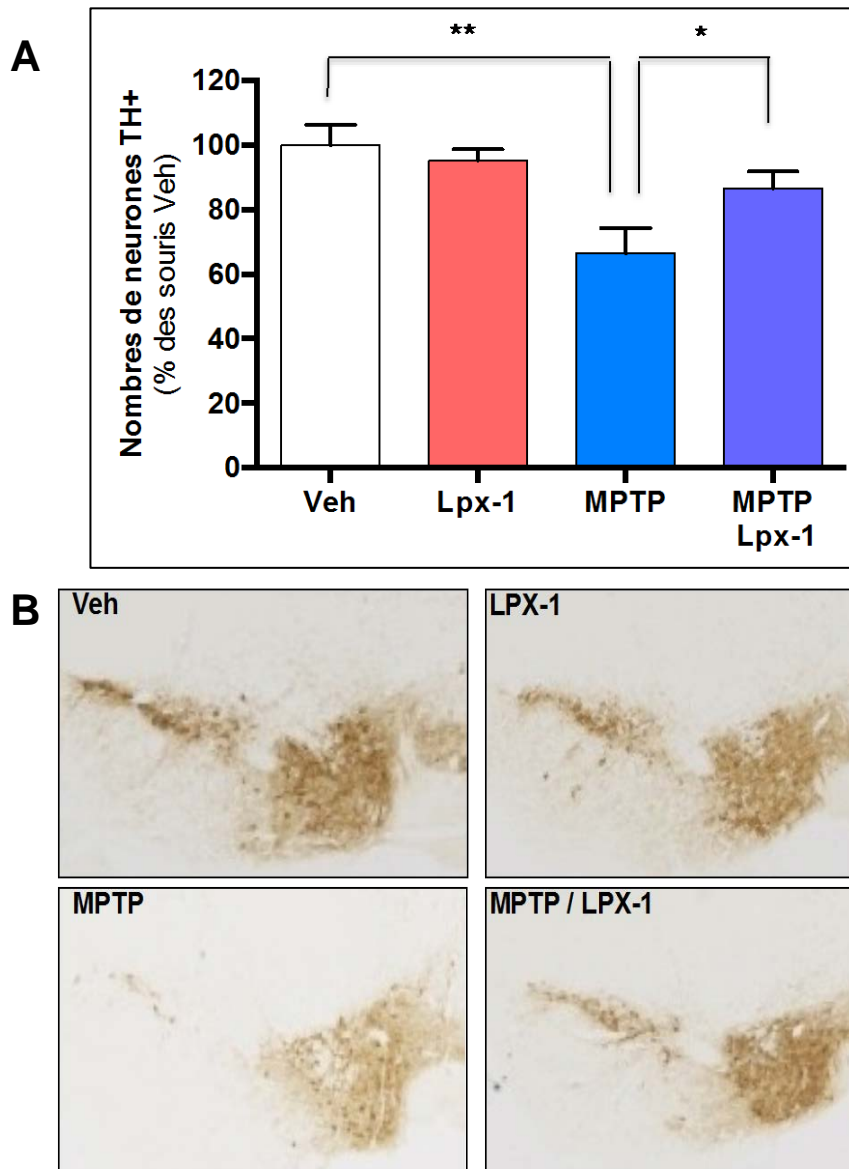


Figure 59 : Effet de la liproxstatine-1 sur les neurones dopaminergiques de la substance noire. (A) Comptage des neurones dopaminergiques de la SN. (B) Image de l'immunomarquage de la TH dans la substance noire. \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ;  $n = 10$

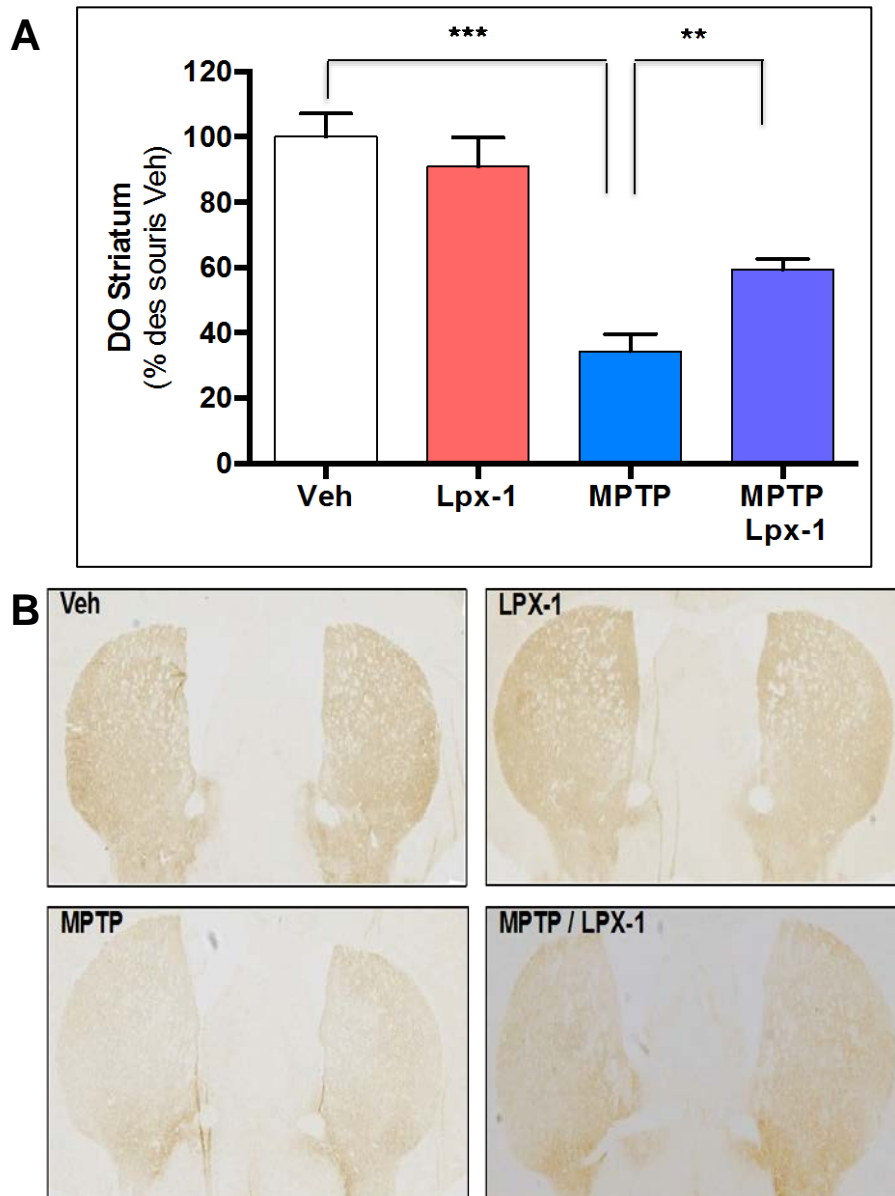


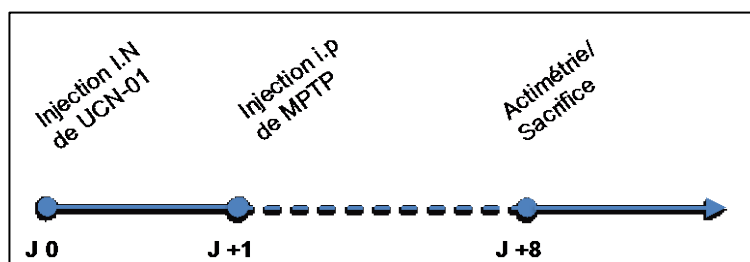
Figure 60 : Effet de la liproxstatine-1 sur les fibres dopaminergiques du striatum. (A) Mesure de la densité optique de la TH dans le striatum. (B) Image de l'immunomarquage de la TH dans le striatum. \*\*\*\* $p < 0,0001$

## 4. Effet de l'inhibiteur de PKC sur le modèle MPTP

### A. Schéma du protocole et effectif des groupes

Enfin, la dernière approche *in vivo* sur ce modèle MPTP est l'utilisation d'un inhibiteur de PKC. Les inhibiteurs de PKC sont très utilisés dans la thérapeutique de différents cancers. Nous avons donc choisi un inhibiteur, l'UCN-01, déjà utilisé dans un modèle animal contre un glioblastome et qui fait l'objet d'un essai clinique afin de faciliter sa potentielle utilisation comme agent thérapeutique contre la ferroptose.

En se basant sur la littérature et sur des résultats *in vitro*, la dose que nous avons choisi est de  $0,5\mu\text{M}$  que l'on administre par voie intranasale selon le protocole de la **figure 61**.



**Figure 61** : Time-line du protocole expérimental de l'expérience avec UCN-01

Pour cette dernière expérimentation *in vivo*, quatre groupes ont été créés (Veh ; UCN-01 ; MPTP ; MPTP/UCN-01) dont les effectifs sont de 10 souris pour chacun de ces groupes (**tableau VII**).

**Tableau VII** : Répartition des effectifs pour l'expérimentation avec la ferrostatine-1

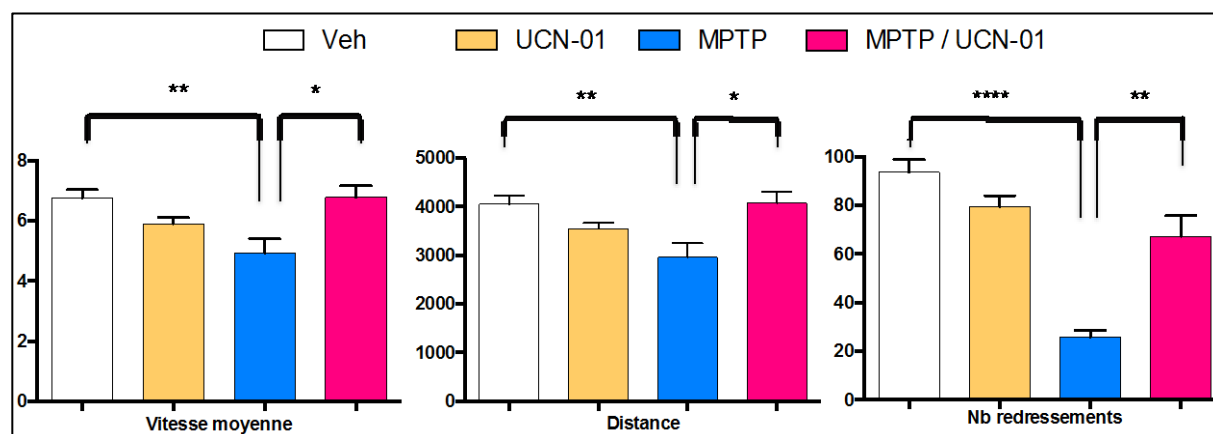
Groupe	Contrôle DMSO1% PBS (Veh)	UCN-01 0,5 $\mu\text{M}$	MPTP	MPTP / UCN- 01 0,5 $\mu\text{M}$
Effectif	10	10	10	10

### B. Effet de l'inhibiteur de PKC (UCN-01) sur l'activité locomotrice

Les résultats du test d'actimétrie montrent que le MPTP diminue de façon significative la vitesse moyenne ( $4,9 \pm 1,2\text{cm/s}$ ,  $p < 0,01$ ), la distance parcourue ( $2955 \pm 700\text{cm}$ ,  $p < 0,01$ ) et le nombre de redressements est, quant à lui, très fortement diminué ( $25 \pm 7$ ,  $p < 0,0001$ ).



Ils nous permettent également d'observer que lorsque les souris sont traitées avec l'inhibiteur de PKC, la vitesse moyenne ( $6,8 \pm 1\text{cm/s}$ ,  $p < 0,05$ ), la distance parcourue ( $3834 \pm 385\text{cm}$ ,  $p < 0,05$ ) et le nombre de redressements ( $68 \pm 12$ ,  $p < 0,01$ ) sont significativement restaurés par UCN-01 (**Figure 62**).



**Figure 62 : Effet de l'inhibiteur de PKC (UCN-01) sur l'activité locomotrice des souris MPTP.** \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  ;  $n = 10$

### C. Effet de l'inhibiteur de PKC sur les neurones dopaminergiques

#### i. Substance Noire

Dans la substance noire, la **figure 63** montre que le MPTP induit une dégénérescence dopaminergique significative de 66% ( $p < 0,01$ ). Lorsque les souris sont prétraitées avec UCN-01, on observe une neuroprotection de 19% des fibres dopaminergiques ( $p < 0,05$ ). Une illustration de ces résultats est représentée sur la **figure 63B**

#### ii. Striatum

La **figure 64** montre que le MPTP a été très efficace sur les fibres dopaminergiques puisque nous observons une perte de 82% ( $p < 0,001$ ) des neurones dopaminergiques. Lorsque les souris MPTP sont prétraitées avec UCN-01, on observe une légère neuroprotection de 16% des fibres dopaminergiques ( $p < 0,05$ ). Une illustration de ces résultats est représentée sur la **figure 64B**

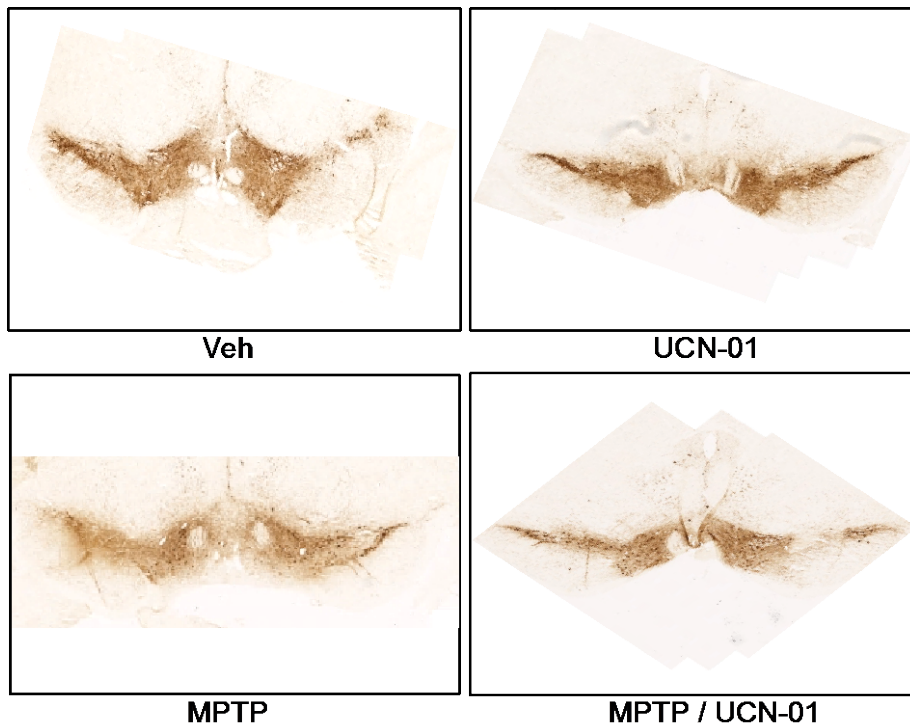
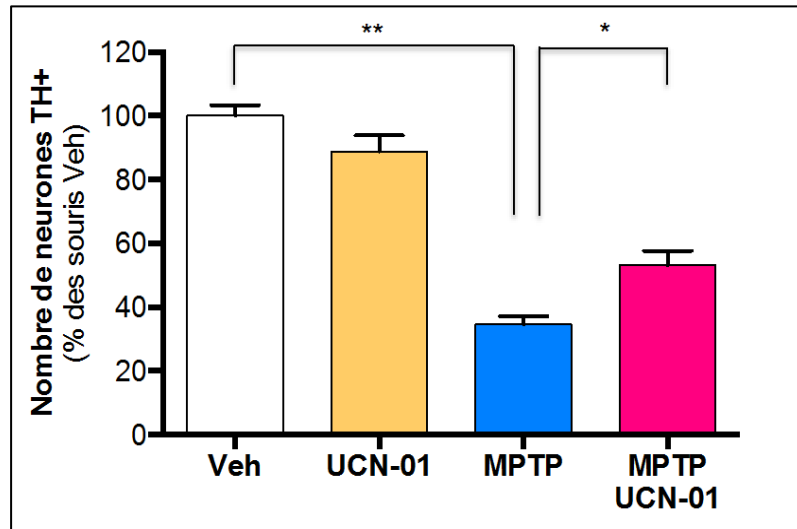


Figure 63 : Effet de UCN-01 sur les neurones dopaminergiques de la substance noire. (A) Comptage des neurones dopaminergiques de la SN. (B) Image de l'immunomarquage de la TH dans la substance noire.

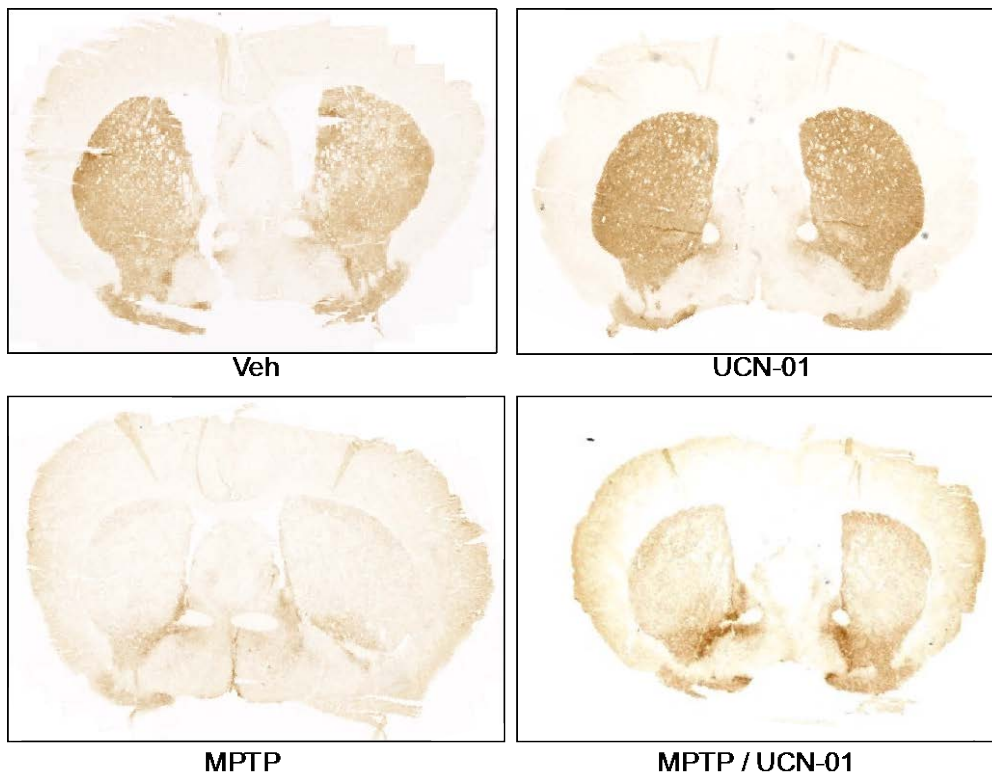
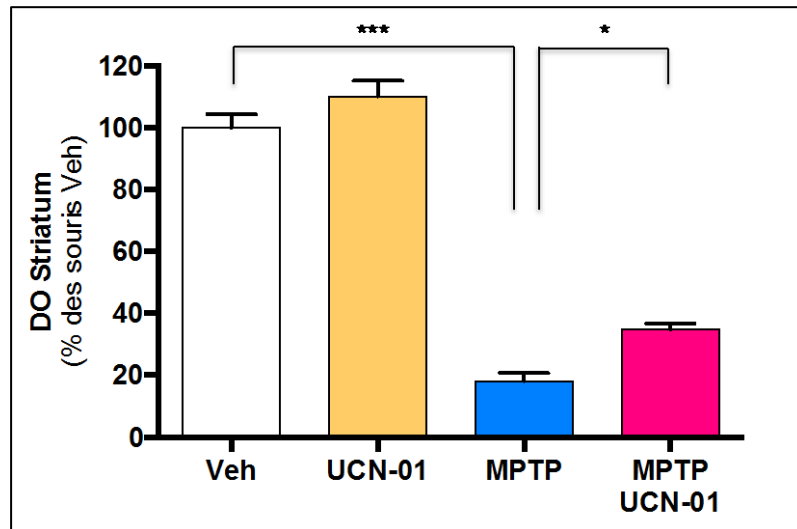


Figure 64 : Effet de la UCN-01 sur les fibres dopaminergiques du striatum (A) Comptage des neurones dopaminergiques de la SN. (B) Image de l'immunomarquage de la TH dans le striatum. : \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ;  $n = 10$

## 5. Discussion

En utilisant le meilleur modèle expérimental de la maladie de Parkinson et le plus utilisé dans ce domaine de recherche, nous avons confirmé l'implication de la ferroptose dans la mort des neurones dopaminergiques, résultats obtenus *in vitro*, *ex-vivo* et donc *in vivo*. De plus, nous avons également montré que l'inhibiteur de la PKC est capable de protéger la perte dopaminergiques induite par le MPTP, renforçant notre hypothèse selon laquelle la PKC est un médiateur de la ferroptose dans la mort des neurones dopaminergiques et par extension, dans la maladie de Parkinson.

Ces résultats importants nous incitent à conclure que certaines des caractéristiques *in vivo* de la maladie de Parkinson pourrait être dues à l'induction de ferroptose dans les neurones dopaminergiques. Par conséquent, nous faisons l'hypothèse que l'inhibition de la ferroptose peut être neuroprotecteur dans la maladie de Parkinson.

## Article



## Neurobiology of Disease

Available online 14 May 2016

In Press, Accepted Manuscript — Note to users



## Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson's disease that is regulated by PKC

Bruce Do Van<sup>a</sup>, Flore Gouel<sup>a</sup>, Aurélie Jonneaux<sup>a</sup>, Kelly Timmerman<sup>a</sup>, Patrick Gelé<sup>b</sup>, Maud Pétrault<sup>a</sup>, Michèle Bastide<sup>a</sup>, Charlotte Laloux<sup>a</sup>, Caroline Moreau<sup>c</sup>, Régis Bordet<sup>a</sup>, David Devos<sup>a, b, c</sup>, Jean-Christophe Devedjian<sup>a, b, c, d</sup>  

[Show more](#)

doi: 10.1016/j.nbd.2016.05.011

[Get rights and content](#)

### Highlights

- This study is the first to emphasize the role of ferroptosis in Parkinson' Disease.
- Ferroptosis was characterized in LUHMES cells, ex vivo and in vivo.
- Some of the observed characteristics of ferroptosis differed from those reported previously.
- Ferroptosis may be initiated by PKC $\alpha$  activation, in a RAS-independent manner.
- Iron chelators, Fer-1 and PKC inhibitors may prevent neuron loss in Parkinsonians.

### Abstract

Parkinson's disease (PD) is a complex illness characterized by progressive dopaminergic neuronal loss. Several mechanisms associated with the iron-induced death of dopaminergic cells have been described. Ferroptosis is an iron-dependent, regulated cell death process that was recently described in cancer. Our present work show that ferroptosis is an important cell death pathway for dopaminergic neurons. Ferroptosis was characterized in Lund human mesencephalic cells and then confirmed ex vivo (in organotypic slice cultures) and in vivo (in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model). Some of the observed characteristics of ferroptosis differed from those reported previously. For example, ferroptosis may be initiated by PKC $\alpha$  activation, which then activates MEK in a RAS-independent manner. The present study is the first to emphasize the importance of ferroptosis dysregulation in PD. In neurodegenerative diseases like PD, iron chelators, Fer-1 derivatives and PKC inhibitors may be strong drug candidates to pharmacologically modulate the ferroptotic signaling cascade.

### Keywords

Parkinson's disease; Ferroptosis; Lund human mesencephalic cells; 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model

**Ferroptosis, a newly characterized form of cell death  
in Parkinson's Disease that is regulated by PKC**

Bruce Do Van <sup>1</sup>, Flore Gouel <sup>1</sup>, Aurélie Jonneaux <sup>1</sup>, Kelly Timmerman <sup>1</sup>,  
Patrick Gelé <sup>2</sup>, Maud Pétrault <sup>1</sup>, Michèle Bastide <sup>1</sup>, Charlotte Laloux <sup>1</sup>,  
Caroline Moreau <sup>3</sup>, Régis Bordet <sup>1</sup>, David Devos <sup>1-3</sup> and Jean-Christophe  
Devedjian <sup>1-4\*</sup>.

*1- INSERM, UMR\_S1171, Lille Nord de France University, Lille, France*

*2- Biological Resources Centre, Lille University Hospital, Lille, France*

*3- Department of Movement Disorders and Neurology, CHRU of Lille, France.*

*4- University of the Littoral Opal Coast, Calais, France*

\* Corresponding author at : Jean-Christophe.Devedjian@univ-littoral.fr

## Abstract

Parkinson's disease (PD) is a complex illness characterized by progressive dopaminergic neuronal loss. Several mechanisms associated with the iron-induced death of dopaminergic cells have been described. Ferroptosis is an iron-dependent, regulated cell death process that was recently described in cancer. Our present work show that ferroptosis is an important cell death pathway for dopaminergic neurons. Ferroptosis was characterized in Lund human mesencephalic cells and then confirmed *ex vivo* (in organotypic slice cultures) and *in vivo* (in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model). Some of the observed characteristics of ferroptosis differed from those reported previously. For example, ferroptosis may be initiated by PKC  then activates MEK in a RAS-independent manner. The present study is the first to emphasize the importance of ferroptosis dysregulation in PD. In neurodegenerative diseases like PD, iron chelators, Fer-1 derivatives and PKC inhibitors may be strong drug candidates to pharmacologically modulate the ferroptotic signaling cascade.

## Introduction

Parkinson's disease (PD), the second most prevalent age-related neurodegenerative disorder, is characterized by the degeneration of substantia nigra pars compacta (SNpc, an iron-rich, dopamine (DA)-producing midbrain nucleus). The presence of both iron and DA probably explains why the SNpc is exposed to a high risk of selective cell death (Ayton et al., 2015; Hare et al., 2015). Several mechanisms associated with iron-induced death of dopaminergic cells have been described: (i) a series of redox reactions producing hydroxyl radicals (the most toxic reactive oxygen species, ROS) (Linert and Jameson, 2000) (Fenton, 1894); (ii) monoamine oxidase B (MAO-B, which catalyzes the oxidative deamination of DA) is an additional endogenous source of ROS (Youdim and Riederer, 2004); (iii) DA metabolites can react with iron and  $H_2O_2$  to form the neurotoxic compound 6-hydroxydopamine (Napolitano et al., 2011) and (iv) iron increases the rate of  $\alpha$ -synuclein fibril formation - a major event in PD (Uversky et al., 2001). A number of iron chelators have displayed neuroprotective properties in preclinical screens (Weinreb et al., 2013). In this respect, we recently reported that iron chelation treatment with deferiprone (DFP, a currently marketed drug with a good safety profile) has neuroprotective potential in early-stage PD patients (Devos et al., 2014).

Dixon et al. recently discovered ferroptosis (a new iron-dependent, regulated process of cell death that is distinct from apoptosis, necrosis and autophagy) while seeking to understand the mechanism of action of erastin - a small molecule that selectively kills cells expressing oncogenic RAS mutants (Dixon et al., 2012; Dolma et al., 2003). Neurons and cancer cells achieve their common outcome (long-term survival) by inhibiting apoptosis (Vaughn and Deshmukh, 2008). In addition to ferroptosis' role in cancer cells, this process can also be dysregulated under certain pathophysiological conditions. It is not at all known whether ferroptosis is involved in PD but it has been suggested that the inhibition of ferroptosis may be neuroprotective (Dixon et al., 2012; Skouta et al., 2014).

Our present results showed that the characteristic features of ferroptosis were present in differentiated Lund human mesencephalic (LUHMES) cells intoxicated with



erastin. Given that primary dopaminergic neurons can only be cultured on a small scale, LUHMES cells constitute an excellent cell-based model of PD. We found that the characteristics of ferroptosis in LUHMES cells differed from those reported for other cell lines in the literature. The calcium chelator 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA) and protein kinase C (PKC) inhibitors (the bisindolylmaleimide analog Bis-III and small interfering RNA (siRNA)) were very effective in counteracting erastin-induced cell death. Our results suggest that in LUHMES cells, ferroptosis requires activated mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) signaling but is independent of Ras activation. This may be due to the specific metabolism profile of dopaminergic cells. The LUHMES cell line appears to be a powerful tool for studying the impact of ferroptosis in nerve cells.

Moreover, ferroptosis' involvement in dopaminergic cell death was confirmed in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse, a well-established animal model of PD. Indeed, MPTP's toxicity was inhibited by the specific ferroptosis inhibitor ferrostatin 1 (Fer-1). Lastly, the regulation of dopaminergic cell death by ferroptosis and its inhibition by PKC were also confirmed *ex vivo* by studying organotypic slice cultures (OSCs).

Our results emphasize the importance of ferroptosis dysregulation in PD. Moreover, they suggest that the *in vivo* ferroptotic signaling cascade will be receptive to pharmacological intervention with PKC inhibitors.

## Results and Discussion

### Ferroptosis is a very effective pathway for inducing LUHMES cell death

LUHMES cells are conditionally immortalized human neuronal precursor cells. They display an extremely high (>99%) rate of conversion to post-mitotic neurons expressing dopaminergic markers, presenting neurite outgrowth and showing electrophysiological properties. The robust neuronal status of LUHMES cells has been extensively studied (Schildknecht et al., 2013). We determined whether or not differentiated LUHMES cells, NSC34 motor-neuron-like cells and SH-SY5Y neuroblastoma cells were able to survive treatment with specific inducers of regulated cell death pathways (**Figure 1A**). NSC34 and

SH-SY5Y cells were highly sensitive to apoptosis induced by staurosporine (Hemendinger et al., 2008; Robert et al., 2012). These two cell lines were much less sensitive to rapamycin-induced autophagy and were totally resistant to erastin-induced ferroptosis. In contrast, erastin was a very potent inducer of cell death in LUHMES cells. Staurosporine was moderately effective and rapamycin had a slight effect at the highest doses only. In fact, erastin was a more potent inducer of ferroptosis in LUHMES cells than in the BJ-TERT/LT/ST/RASV cell line engineered by Dolma et al. ((Dolma et al., 2003); 50% cell death was obtained with approximately 0.5  $\mu$ M and 1  $\mu$ M of erastin, respectively). Erastin-induced ferroptosis is characterized by a marked increase in cytosolic and lipidic oxidative stress, in contrast mitochondrial oxidative stress did not appear to be affected. By using the probes mentioned above, we confirmed that the characteristic features of ferroptosis were indeed present in erastin-treated LUHMES cells (**Figure 1B**). To ensure that our measurements of cell viability by PI incorporation were not biased (by uncontrolled PI influx for example) cell viability upon erastin treatments with a larger dose range or different incubation times were done using a MTS reduction assay (**figure 1C** and **1D**). In both experiments drastic effects of erastin on LUHMES viability were measured. Global intracellular oxidative stress following erastin treatment was confirmed by the dosage of total glutathione content (**figure 1E**). The significant decrease observed, starting with the dose of 0.3  $\mu$ M, was consistent with the described action of erastin as inhibitor of cysteine import (Dixon et al., 2012). As expected, in LUHMES cells we were able to specifically inhibit ferroptosis with DFP and the anti-oxidant N-acetylcysteine (NAC) whereas the apoptosis and autophagy inhibitors tested (Z-Vad and CQ) were ineffective (**Figure 1F**).

We next wondered whether other neurotoxins could induce ferroptosis. Hence, we intoxicated LUHMES cells with known neurotoxic drugs and measured the effect of the specific ferroptosis inhibitors Fer-1 and DFP (**Figure 1G**). The toxic effect of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) was completely counteracted by Fer-1 and cell survival doubled after treatment with DFP. Rotenone (which also reportedly acts on complex I) was only counteracted by DFP. In a lesser extend Paraquat toxicity (PQ, which also acts on complex I)

was also counteracted by DFP. The lethal effect of NEM was significantly neutralized by Fer-1 and by DFP. As in the experiments performed on hippocampal OSCs (Dixon et al., 2012), the toxicity of glutamate could also be alleviated by Fer-1 and DFP. The induction of ferroptosis by buthionine sulphoximine (BSO) (Yang et al., 2014) was inhibited by Fer-1 only. Exposure of neurons to 6-hydroxydopamine (6-OHDA) or high doses of DA causes toxicity via free radical production. Fer-1 and DFP showed very slight effects against 6-OHDA toxicity but the sensitivity of LUHMES cells to DA was blocked by Fer-1 and by DFP. DA's toxicity appears to be mediated by at least two convergent pathways: auto-oxidation of DA and stimulation of the dopamine receptor (D1) (Wersinger et al., 2004). Stimulation of D1 receptors appears to induce sustained stimulation of the MEK pathway (Chen et al., 2009). We therefore also tested the effects of DA, DFP and/or erastin on LUHMES cell viability (**Figure 1H**). At low non-toxic doses, DA increased the cells' sensitivity to erastin. DFP was able to block this combined toxicity. Taken as a whole, our results suggest that the neurotoxins commonly used in models of PD induce ferroptosis in LUHMES cells.

### **Targets of erastin and GPX4 expression**

Erastin binds to all three isoforms of the human mitochondrial voltage-dependent anion channels (VDAC1, 2 and 3) (Yagoda et al., 2007). The mitochondrial solute carrier SLC7A5 (the subunit of cell surface amino acid transporters that imports cysteine and neutral amino acids (Kanai and Endou, 2003)) was also found to be bound to an erastin analog (Dixon et al., 2012).

Previous research has suggested that VDACs are probably factors in PD-associated neurodegeneration (Sun et al., 2012) (Triplett et al., 2015). The mRNAs of all three VDAC isoforms are expressed in LUHMES cells (**Figure 2A and B**) but the mRNA for VDAC3 is about 50 times more abundant than the mRNA for VDAC1 and 2500 times more abundant than that for VDAC2; hence, VDAC3 is considered to be an important mediator of erastin's action (Yagoda et al., 2007). The high expression levels of this VDAC isoform in LUHMES cells may be correlated with the cell line's sensitivity to ferroptosis.

Dixon et al. have suggested that erastin binding to SLC7A5 interferes in trans with cysteine uptake by system X<sub>c</sub><sup>-</sup> (Dixon et al., 2012). In turn, this may lead to compensatory transcriptional upregulation of SLC7A11 (Lo et al., 2008). Consistently, Dixon et al. observed substantial upregulation of SLC7A11 in erastin-treated HT-1080 cells. We observed overexpression of SLC7A11 upon erastin treatment of LUHMES cells (**Figure 2C**). Potentially compensatory upregulation of SLC7A5 mRNA was also observed. The cell death induced when system X<sub>c</sub><sup>-</sup> is inhibited by high levels of glutamate was originally referred to “oxytosis”; this process is characterized by elevated ROS levels and strong calcium influx prior to cell death. Glutamate-induced cell death can be inhibited by iron chelation. Despite clear mechanistic similarities between oxytosis and ferroptosis, calcium chelators had no effect on the erastin-induced death of HT-1080 cells - arguing against a role for calcium influx in this process (Dixon et al., 2012). However, we found that the calcium chelator BAPTA was effectively inhibited the erastin-induced death of LUHMES cells (**Figure 1F**). This may be a characteristic of ferroptosis, which is specific to the metabolism of dopaminergic cells. The above-mentioned differences between LUHMES cells and neuron cell lines may be of value in understanding ferroptosis.

Using real-time PCR, we also analyzed the expression of the three VDAC isoforms and the three SLCs in mRNA extracted from human biopsy samples of the prefrontal cortex (PFC), cortex (CO), SN and striatum (STR) (**Figure 2D**). We quantified the expression of tyrosine hydroxylase (TH) in the SN and STR as a marker of neuron survival. All VDAC isoforms and all three SLCs were expressed in all four regions. In the CPF and CO, we did not observe any significant differences between control and PD samples. In the SN, we observed marked differences between control and PD samples. This was not so surprising, when considering the levels of TH in these samples. Furthermore, the genes for the VDAC isoforms and SLCs were over-expressed, relative to TH (**Figure 2E**). The greatest effect was seen for SLC7A11, which agrees with the compensatory transcriptional upregulation expected during ferroptosis. In both control and PD samples of the STR, the gene expression profile was much same as in the SN (albeit with fewer differences).

We quantified the expression of glutathione peroxidase 4 (GPX4), a major regulator of ferroptosis (Yang et al., 2014). The GPXs are essential for maintaining the cell's redox balance (Arthur, 2000) and GPX4 was involved in neuron loss, neurodegeneration (Yoo et al., 2012) and PD in particular (Zeevalk et al., 2008) (Blackinton et al., 2009). Despite the low proportion of TH-positive neurons in our PD biopsy samples, we observed marked upregulation of GPX4 mRNA in the SN (**Figure 2D**). This upregulation was not observed in the other regions of the brain studied. This result is fully consistent with Bellinger et al.'s evaluation of the pattern of GPX4 expression in the nigrostriatal pathway (Bellinger et al., 2011). The latter researchers reported that GPX4 colocalizes with neuromelanin in SN dopaminergic neurons, is expressed at low levels in the PD midbrain, and is associated with dystrophic axons in the PD putamen. Taken as a whole, these results suggest that in PD, GPX4 is upregulated (or that GPX4-expressing cells survive longer) and ferroptosis is dysregulated.

### **In the mouse, MPTP's toxic effect on dopaminergic neurons can be inhibited by fer-1.**

Administration of MPTP to mice predominantly damages the nigrostriatal pathway. We have previously evidenced a marked loss of TH-positive neurons and the presence of characteristic motor impairments in this animal model of PD (Devos et al., 2014). The degree of neuroprotection afforded by Fer-1 was evaluated in the MPTP mouse model. Due to pharmacological limitations (Fer-1 does not cross the blood-brain-barrier) Fer-1 was directly injected into the brain one day before acute intoxication with MPTP. As expected, MPTP-intoxicated mice presented significant changes in behavior and lost 50% of the TH-positive neurons in the SN and STR. Our results show clearly that Fer-1 can counter behavioral impairments and protects against cell loss (**Figure 3**). These important results prompt us to conclude that some of the *in vivo* hallmarks of PD could be due to induction of ferroptosis in dopaminergic neurons. We therefore hypothesize that the inhibition of ferroptosis may be neuroprotective in PD.

### In dopaminergic cells ferroptosis is regulated by PKC.

Erastin is more lethal in human tumor cells harboring mutations in the oncogenes HRAS, KRAS and BRAF involved in the RAS–RAF–MEK signaling pathway (Yagoda et al., 2007). In an effort to identify the kinases involved in glutamate-mediated oxidative stress, Kang et al. screened the compounds in a kinase inhibitor library for their ability to protect neuronal cells; Flt3 and PI3K

inhibitors b

(Kang et al., 2014). We therefore decided to test inhibitors of key signaling pathways in LUHMES cells (**Figure 4A**). An Flt3 inhibitor was able to protect LUHMES cells from ferroptosis very effectively by inducing a strong reduction in lipid peroxidation levels (data not shown). In contrast, neither a PI3K

inhibitor no

the Kang et al.'s results with HT22 cells, our results in LUHMES cells are more consistent with the known role of PI3K/Akt in cell survival. It is likely that PI3K/Akt's effects depend on the cellular context. The effect of U0126 and the involvement of the MEK signaling pathway is consistent with the initial work on ferroptosis (Dixon et al., 2012; Yagoda et al., 2007). Treatment with mamumycin A (which abolishes basal Ras activity) could not inhibit erastin's effects on cell survival. This suggested that in LUHMES cells, ferroptosis requires activated MEK signaling but is independent of Ras activation. Ras-independent MEK/ERK activation has already been reported. For example, stimulation of keratinocytes with extracellular calcium resulted in activation of Raf isozymes and their downstream effector ERK but also led to downregulation of Ras activity (Schmidt et al., 2000a). Raf- and Ras-independent links between PKC  activation in the triggering of sustained ERK (MAPK) signaling and cell cycle arrest have been reported in the HepG2 human hepatoma cell line (Wen-Sheng, 2006). Consistently, we found that both calcium chelation and PKC inhibition effectively inhibit ferroptosis in LUHMES cells.

BisIII was able to protect against cell death induced by erastin and also by BSO (data not shown). BisIII protected all of the cells - even at the most lethal doses of erastin (**Figure 4B**). To confirm BisIII's action on PKC phosphorylation, we performed a Western blot with

antibodies against PKC and phospho-PKC (Figure 4C). We observed that erastin treatment activated PKC, which is a common feature of all PKC isoforms (Zhang and Su, 2014). BisIII inhibited PKC activation. With PKC's isoform-specific siRNAs, our results showed that only the siRNA directed against the  $\delta$  isoform effectively protected against ferroptosis (Figure 4D). PKC inhibition had no effect on erastin's lethality in LUHMES cells, suggesting that erastin's lethality in LUHMES cells is due to PKC activation, (independently of Ras) to promote ferroptosis. The involvement of PKC in ferroptosis may be a specific feature of dopaminergic cells, and thus might explain some of the observed differences between the cell lines in which ferroptosis has been studied to date.

Inhibition by BisIII of PKC activation by erastin was also found with the ferroptotic inhibitors tested (figure 4F). Only DFP was maybe slightly less effective. Apart of glutamate and 6-OHDA, the neurotoxins tested were able to activate the phosphorylation of PKC (figure 4G; a result that may partially explain the ineffectiveness of Fer-1 and DFP against 6-OHDA toxicity, cf figure 1G). Fer-1 and DFP could inhibit such activations. These results re-enforce (i) the links between ferroptosis and PKC and (ii) the role of this kinase on dopaminergic cell survival.

Using hippocampal OSCs, Dixon et al. demonstrated that fer-1 prevents glutamate-induced toxicity (Dixon et al., 2012). We therefore screened for ferroptosis on OSCs from the STR. Propidium iodide (PI) uptake by the nerve endings of dopaminergic cells was recorded as an indicator of cell death. Our results showed that erastin (like MPP+) induced cell death specifically in the STR. Lastly, the lethality of MPP+ and erastin were abolished by Fer-1 and BisIII respectively - confirming both ferroptosis' involvement in dopaminergic cell death and its regulation by PKC (Figure 4H).

A putative link between PKC and ferroptosis in PKC have already been described in the pathogenesis of neuronal disorders (Zhang and Su, 2014). It is even possible that PKC's influence on ferroptosis may be exerted directly through erastin's targets (such as the VDACs). VDAC phosphorylation is considered to be a

marker for the balance between survival and cell death. All the VDAC isoforms studied to date can be phosphorylated by a range of kinases (including PKC) (Martel et al., 2014)).

## Conclusions

Our results emphasize the importance of ferroptosis dysregulation in PD. As already suggested by Friedman Angeli et al. (Friedmann Angeli et al., 2014), our results also suggest that it may be possible to pharmacologically modulate the ferroptotic signaling cascade *in vivo*. In neurodegenerative diseases like PD (in which oxidative stress has a pathogenic role), iron chelators, Fer-1 derivatives and PKC inhibitors may be strong drug candidates.

## Materials & Methods

**Chemicals.** Advanced DMEM/F12, L-glutamine, fetal bovine serum, penicillin streptomycin, N2 supplement, recombinant bFGF, hydroethidium, C-11 bodipy and MitoSox were purchased from Life Technologies (Saint Aubin, France). cAMP, erastin, staurosporin, rapamycin, Chloroquine diphosphate (CQ), Z-vad-fmk, N-Acetyl-L-Cysteine, 1-Methyl-4-phenylpyridinium iodide (MPP+), N-ethylmaleimide (NEM), Dopamine hydrochloride (DA), rotenone, glutamate, BAPTA-AM, Manumycin A (Ras inhibitor), U0126 (MEK inhibitor) and propidium iodide were obtained from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France). MK-2206 (Akt inhibitor), U73122 (PLC inhibitor) and Bisindolymaléimide III (Bis III; PKC inhibitor) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Le Perray en Yvelines, France). Flt3 Inhibitor III and PI3Ka Inhibitor VIII were obtained from Merck Millipore (Fontenay sous bois, France). Deferiprone (DFP) were obtained from ApoPharma (Toronto, Canada).

**Cell line.** The LUHMES cell line used in the studies was a gift from Pr. Marcel Leist (In vitro Toxicology and Biomedicine, University of Konstanz). Cells were maintained in proliferation medium (Advanced DMEM/F12, 1X N<sub>2</sub> supplement, 2 mM L-glutamine and 40 ng/ml recombinant bFGF) in Nunclon™ cell culture flasks precoated with 50 µg/ml poly-L-ornithine and 1 µg/ml fibronectin, and were subcultured every 2-3 days. For differentiation, Luhmes



cells were grown in culture flasks for 2 days in differentiation medium (advanced DMEM/F12, 1X N<sub>2</sub> supplement, 2mM L-glutamine, 1mM cAMP, 1µg/ml tetracycline and 2ng/ml recombinant GDNF). Cells were then seeded in 24 well plate at  $0.25 \times 10^6$  cells per well or in 6-well plate at  $1.1 \times 10^6$  cells per well for additional 3 days.

**Flow cytometry.** For flow cytometry, differentiated and treated cells are trypsinized for 5 minutes at 37 ° C. Then cells are centrifuged at 2000 rpm for 5 minutes. The supernatant is removed and the cells are resuspended in PBS. According to the parameter to be measured, we add the corresponding cytometric probe. Viability is measure with supravital dye Propidium Iodide (0.5µM), cytosolic stress with hydroethidine (2.5µM), lipidic stress with C-11 Bodipy (1µM) and mitochondrial stress with MitoSox (1µM). Analyses were performed with a CANTO II flow cytometer with Argon laser -488nm- and -561nm-, BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA) on samples with 10,000 cells using DIVA software (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA).

**MTS reduction assay.** 50000 differentiated cells/well are seeded in a 96-well plate. At day 5, cells are treated for 24h hours with a range of erastin. MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) (Promega) was added directly to the cell culture medium and incubated for 2h at room temperature. Absorbance was detected at 490nm.

**Glutathione determination.** Cells were washed twice with PBS and lysed in 200 µl of 5% metaphosphoric acid (w/v) on ice. The lysates were collected, sonicated 3–4 times on ice and centrifuged at 12,000 ×g for 5 min at 4 °C to remove cell debris. Total glutathione content (GSH + GSSG) was determined by the OxiSelect Total Glutathione (GSH/GSSG) assay kit (Cell Biolab). Glutathione Reductase reduces oxidized glutathione (GSSG) to reduced glutathione (GSH) in the presence of NADPH. Subsequently, the chromogen reacts with the thiol group of GSH to produce a colored compound that absorbs at 405nm. The rate of

chromophore production is proportional to the concentration of glutathione within the sample. Standard curves were performed by serial dilutions ranging from 1000 nM to 7.8 nM.

**Real-Time Quantitative PCR.** RT reaction from 1 µg total RNA, extracted with Extract-all (Eurobio, Les Ulis, France) according to the kit manufacturer protocol, was performed using SuperScript® III Reverse Transcriptase (Fischer Scientific, Illkirch, France). Real-time qPCR was performed using a LightCycler system according to the manufacturer's instructions with LightCycler-FastStartDNA Master SYBR Green mix (Roche Applied Science, Meylan, France). Quantification data represent the mean of three experiments realized in duplicate. The threshold cycles (Ct) were determined for each gene and gene expression levels were calculated as relative expression compared with TBP. Relative quantification analyses were performed by the LightCycler Software (Roche Applied Science).

Gene of interest	RefSeq	Sequence	T <sub>m</sub> (°C)
TBP up	<u>NM_003194.4</u>	5'-CGGCTGTTTAACTTCGCTTC	57
TBP low		5'-CACACGCCAAGAAACAGTGA	57,4
VDAC 1 up	<u>NM_003374.2</u>	5'-CAGGCTCCTGTGTCTGCTG	57,7
VDAC 1 low		5'-TGAAGACATCCCTGGCAGA	55,4
VDAC 2 up	<u>NM_001184783.1</u>	5'-CAGCAGCTTCTGCCTTCC	56,6
VDAC 2 low		5'-CAACTCCAACCTGCTCCAG	56,3
VDAC 3 up	<u>NM_005662.6</u>	5'-CTGCATGTCCCACACCATT	56,6
VDAC 3 low		5'-TGATGCAAAACCAAAGATTCC	55,2
SLC7A5 up	<u>NM_003486.5</u>	5'-ACACCCTCTGCCGAGTAATG	56,9
SLC7A5 low		5'-AGCCATTAACACAGAATAAAGAAGG	55,9
SLC3A2 up	<u>NM_001012662.2</u>	5'-TGAGTGAACCCCAAATAGG	55,9
SLC3A2 low		5'-TGAGAGAAGCAGAGGGAAGACT	55,9
SLC7A11 up	<u>NM_014331.3</u>	5'-AGCAGCAGCAGCAGTGGT	59,1
SLC7A11 low		5'-CTGTGTATGCATCGTGCTCTC	55
GPX4 up	<u>NM_002085.4</u>	5'-TTCCCGTGTAAACCAGTTCG	54,7
GPX4 low		5'-CGGCGAACTCTTTGATCTCT	56,4
PKC- $\alpha$ up	<u>NM_002737.2</u>	5'-TCGACTGGGAAAACTGGAG	56,4
PKC- $\alpha$ low		5'-CTCTGCTCCTTTGCCACAC	56,5
PKC- $\delta$ up	<u>NM_006254.3</u>	5'-ATTATCCCCGCTGGATCAC	55,1
PKC- $\delta$ low		5'-CTTGTTGGTTCCCTTTCAA	56,5
PKC- $\varepsilon$ up	<u>NM_005400.2</u>	5'-AACACCCGTACCTTACCCAAC	57,8
PKC- $\varepsilon$ low		5'-CGAAAAAGAGGCGGTCTCT	57,2

**siRNA Transfection.** LUHMES were differentiated for 2 days according to the standard protocol. For transfection, solution A, consisting of 1  $\mu$ l Lipofectamine™ 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and 37,5  $\mu$ l Opti-MEM™ (Life Technologies, CA, USA) were mixed and incubated for 5 min at room temperature. Solution B consists of 15 pmoles of the respective siRNA 37,5 $\mu$ l Opti-MEM™. After 5 min incubation, both solutions were combined and incubated for 25min before to be transfer into 24-well plates. The amounts indicated refer to one well of a 24-well plate. Predifferentiated, trypsinized LUHMES were

then added in a volume of 425µl differentiation medium to the siRNA containing solution at a density of  $3.5 \times 10^5$  cells/well (24-well plate) and thoroughly mixed. Medium was exchanged 24h after seeding (d3). After additional 2 days of differentiation, cells were treated for 24h. siRNAs for PKC $\alpha$ , PKC $\delta$  et PKC $\epsilon$  were purchased from Santa Cruz Biotechnology (sc-36243, sc-36253, sc-36251 respectively)

**Western-blot analysis.** Cells were lysed in RIPA-buffer. Protein determination was performed by using a BCA protein assay kit (Pierce). Twenty-five micrograms of total protein was loaded onto 12% SDS gels. Proteins were transferred onto pvdf membranes (Amersham, Buckinghamshire, UK), washed membranes were then blocked with 5% BSA in TBS-Tween (0.05%) for 2h. Primary antibodies were incubated at 4 °C over night. Following washing steps with TBS-Tween, horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were incubated for 1h at RT, for visualization ECL Western blotting substrate (Pierce) was used. Anti-phospho-PKC and Total PKC antibodies were obtained from Santa Cruz (mouse, 1:500). As secondary antibodies, anti-mouse HRP (1:2000, Jackson Immuno Research) were used.

**Organotypic slice culture.** OSCs were cultured as previously described (Cavaliere et al., 2010) with some modifications. Briefly, Sprague Dawley rat pups (P7) were rapidly decapitated, the brain is extracted and placed in artificial CSF solution. 400 µm thick sections were cut using a vibratome (marque) and immediately plated on Millicell cell culture inserts (Millipore) in Neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with 0,5% B27 (1X, Invitrogen), 2mM L-glutamine (Sigma), 25% horse serum (Gibco) and 25mg/ml gentamycin (Sigma) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Medium was changed every 2-3 days. OSCs were used after 7 days *in vitro*. Propidium iodide (PI, Invitrogen) was used as a fluorescent signal for cell death, and images were taken 24 hours following treatment. The cultures were transferred to PBS supplemented with 5 µg/mL PI. After a 30 minutes incubation, brightfield and PI images were acquired.

**The acute MPTP mouse model.** MPTP-treated mice (5-month-old male C57Bl/6J mice, weighting 28–30 g, from Janvier Le Genest St Isle, France) (MPTP 4x20 mg/kg i.p. over 24 h) received 2,5mM i.c.v. of Ferrostatin-1 (Sigma) or vehicle 1 day before MPTP intoxication. Spontaneous motor activity of mice was recorded over a 10-min period in an actimeter equipped with Actitrack analytical software (Panlab, Barcelona, Spain). The transparent Plexiglas open field was equipped with two frames of infrared beams for measuring horizontal motor activity (distance travelled, speed) and vertical motor activity (rearing). Brain section analyses were performed on 20µm-thick coronal sections prepared from the SN/ventral tegmental area using a microtome (Leica, Nussloch, Germany). Images were acquired using a Zeiss Axio Scan Z.1 slide scanner (20× objective) and Zen software, Blue edition (Zeiss, Oberkochen, Germany). Optic density of striatum is directly measure in Zen Software. The number of TH neurons per sample was counted “treatment blinded” by sterology with Mercator Explora Nova Software.

**Human tissues.** Human brain samples were collected and prepared by the Biological Resource Center of Lille University Hospital. Four regions of interest were selected: the prefrontal cortex, the occipital cortex, the striatum and the substantia nigra. The information available was the clinical record, the conditions of death and the time between the death of the subject and sample freezing (post mortem interval, PMI). A summary of these data is presented. Control subjects were free of neurological or psychiatric disease. Biomolecular analyzes in this study were performed on samples of 3 PD subjects and 3 control subjects. The average age at death and the DPM were not significantly different between the two groups (Student's t test).

N°	Diagnostic	PMI	AGE	SEX
C06-14473	Healthy	18	72	M
C06-26648	Parkinsonian	8	77	F
C08-19292	Healthy	24	80	F
C08-34459	Healthy	11	61	M
C09-11379	Parkinsonian	16	63	M
C09-57130	Parkinsonian	15	70	M

**Statistical analysis.** All data are expressed as means  $\pm$  SEM from at least 3 experiments.

We performed non parametric tests with Mann–Whitney tests for comparisons of two nonrelated groups. For comparison of more than two groups, we used the Kruskal-Wallis test. NS refers to not significant P-values ( $P>0,05$ ) ; \* refers to  $P<0,05$ ; \*\* refers to  $P<0,01$ ; \*\*\* refers to  $P<0,001$  and \*\*\*\* or # refers to  $P<0,0001$ .

Data were evaluated using GraphPad Prism 5 software (San Diego, California, USA).

## Acknowledgments

The authors thank the functional exploration platform for rodents (CPER DN2, University of Lille 2) and the bio-imaging center (Lille – Nord de France). We thank the Professor Marcel Leist for providing the LUHMES cell line, Professor Philippe Marchetti for helpful discussions, Professor Abderrahmani for the use of cell culture facilities and Dr. David Fraser (Biotech Communication, Damery, France) for editorial assistance. The authors thank the French Ministry of Health for funding PHRC grants; the DN2M regional grant; the French Parkinson's Disease Association, Apopharma for providing DFP. The authors have no financial disclosures to make or potential conflicts of interest to report in relation to this academic study. D Devos served on the Scientific Advisory Board for Novartis, Apopharma, Abbvie and Aguetant. D Devos, C Moreau and R Bordet have received honoraria from pharmaceutical companies for consultancy and lectures. The other authors have no disclosures to report.

**References**

- Arthur, J.R., 2000. The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 57, 1825–1835.
- Ayton, S., Lei, P., Hare, D.J., Duce, J.A., George, J.L., Adlard, P.A., McLean, C., Rogers, J.T., Cherny, R.A., Finkelstein, D.I., Bush, A.I., 2015. Parkinson's disease iron deposition caused by nitric oxide-induced loss of  $\beta$ -amyloid precursor protein. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 3591–3597. doi:10.1523/JNEUROSCI.3439-14.2015
- Bellinger, F.P., Bellinger, M.T., Seale, L.A., Takemoto, A.S., Raman, A.V., Miki, T., Manning-Boğ, A.B., Berry, M.J., White, L.R., Ross, G.W., 2011. Glutathione Peroxidase 4 is associated with Neuromelanin in Substantia Nigra and Dystrophic Axons in Putamen of Parkinson's brain. *Mol. Neurodegener.* 6, 8. doi:10.1186/1750-1326-6-8
- Blackinton, J., Kumaran, R., van der Brug, M.P., Ahmad, R., Olson, L., Galter, D., Lees, A., Bandopadhyay, R., Cookson, M.R., 2009. Post-transcriptional regulation of mRNA associated with DJ-1 in sporadic Parkinson disease. *Neurosci. Lett.* 452, 8–11. doi:10.1016/j.neulet.2008.12.053
- Cavaliere, F., Vicente, E.S., Matute, C., 2010. An organotypic culture model to study nigro-striatal degeneration. *J. Neurosci. Methods* 188, 205–212. doi:10.1016/j.jneumeth.2010.02.008
- Chen, J., Rusnak, M., Lombroso, P.J., Sidhu, A., 2009. Dopamine promotes striatal neuronal apoptotic death via ERK signaling cascades. *Eur. J. Neurosci.* 29, 287–306. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06590.x
- Devos, D., Moreau, C., Devedjian, J.C., Kluza, J., Petraut, M., Laloux, C., Jonneaux, A., Ryckewaert, G., Garçon, G., Rouaix, N., Duhamel, A.,

- Jissendi, P., Dujardin, K., Auger, F., Ravasi, L., Hopes, L., Grolez, G., Firdaus, W., Sablonnière, B., Strubi-Vuillaume, I., Zahr, N., Destée, A., Corvol, J.-C., Pörtl, D., Leist, M., Rose, C., Defebvre, L., Marchetti, P., Cabantchik, Z.I., Bordet, R., 2014. Targeting chelatable iron as a therapeutic modality in Parkinson's disease. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 195–210. doi:10.1089/ars.2013.5593
- Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., Morrison, B., Stockwell, B.R., 2012. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149, 1060–1072. doi:10.1016/j.cell.2012.03.042
- Dolma, S., Lessnick, S.L., Hahn, W.C., Stockwell, B.R., 2003. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell* 3, 285–296.
- Fenton, H.J.H., 1894. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans.* 65, 899–910. doi:10.1039/CT8946500899
- Friedmann Angeli, J.P., Schneider, M., Proneth, B., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Hammond, V.J., Herbach, N., Aichler, M., Walch, A., Eggenhofer, E., Basavarajappa, D., Rådmark, O., Kobayashi, S., Seibt, T., Beck, H., Neff, F., Esposito, I., Wanke, R., Förster, H., Yefremova, O., Heinrichmeyer, M., Bornkamm, G.W., Geissler, E.K., Thomas, S.B., Stockwell, B.R., O'Donnell, V.B., Kagan, V.E., Schick, J.A., Conrad, M., 2014. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat. Cell Biol.* 16, 1180–1191. doi:10.1038/ncb3064



- Hare, D.J., Arora, M., Jenkins, N.L., Finkelstein, D.I., Doble, P.A., Bush, A.I., 2015. Is early-life iron exposure critical in neurodegeneration? *Nat. Rev. Neurol.* 11, 536–544. doi:10.1038/nrneurol.2015.100
- Hemendinger, R.A., Armstrong, E.J., Persinski, R., Todd, J., Mougeot, J.-L., Volvovitz, F., Rosenfeld, J., 2008. Huperzine A provides neuroprotection against several cell death inducers using in vitro model systems of motor neuron cell death. *Neurotox. Res.* 13, 49–61.
- Kanai, Y., Endou, H., 2003. Functional properties of multispecific amino acid transporters and their implications to transporter-mediated toxicity. *J. Toxicol. Sci.* 28, 1–17.
- Kang, Y., Tiziani, S., Park, G., Kaul, M., Paternostro, G., 2014. Cellular protection using Flt3 and PI3K $\alpha$  inhibitors demonstrates multiple mechanisms of oxidative glutamate toxicity. *Nat. Commun.* 5, 3672. doi:10.1038/ncomms4672
- Linert, W., Jameson, G.N.L., 2000. Redox reactions of neurotransmitters possibly involved in the progression of Parkinson's Disease. *J. Inorg. Biochem.* 79, 319–326. doi:10.1016/S0162-0134(99)00238-X
- Lo, M., Ling, V., Wang, Y.Z., Gout, P.W., 2008. The xc- cystine/glutamate antiporter: a mediator of pancreatic cancer growth with a role in drug resistance. *Br. J. Cancer* 99, 464–472. doi:10.1038/sj.bjc.6604485
- Martel, C., Wang, Z., Brenner, C., 2014. VDAC phosphorylation, a lipid sensor influencing the cell fate. *Mitochondrion* 19 Pt A, 69–77. doi:10.1016/j.mito.2014.07.009
- Napolitano, A., Manini, P., d'Ischia, M., 2011. Oxidation chemistry of catecholamines and neuronal degeneration: an update. *Curr. Med. Chem.* 18, 1832–1845.

- Robert, G., Puissant, A., Dufies, M., Marchetti, S., Jacquet, A., Cluzeau, T., Colosetti, P., Belhacene, N., Kahle, P., Da Costa, C.A., Luciano, F., Checler, F., Auburger, P., 2012. The caspase 6 derived N-terminal fragment of DJ-1 promotes apoptosis via increased ROS production. *Cell Death Differ.* 19, 1769–1778. doi:10.1038/cdd.2012.55
- Schildknecht, S., Karreman, C., Pörtl, D., Efrémova, L., Kullmann, C., Gutbier, S., Krug, A., Scholz, D., Gerding, H.R., Leist, M., 2013. Generation of genetically-modified human differentiated cells for toxicological tests and the study of neurodegenerative diseases. *ALTEX* 30, 427–444.
- Schmidt, M., Goebeler, M., Posern, G., Feller, S.M., Seitz, C.S., Bröcker, E.-B., Rapp, U.R., Ludwig, S., 2000. Ras-independent Activation of the Raf/MEK/ERK Pathway upon Calcium-induced Differentiation of Keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 275, 41011–41017. doi:10.1074/jbc.M003716200
- Skouta, R., Dixon, S.J., Wang, J., Dunn, D.E., Orman, M., Shimada, K., Rosenberg, P.A., Lo, D.C., Weinberg, J.M., Linkermann, A., Stockwell, B.R., 2014. Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 4551–4556. doi:10.1021/ja411006a
- Sun, Y., Vashisht, A.A., Tchieu, J., Wohlschlegel, J.A., Dreier, L., 2012. Voltage-dependent Anion Channels (VDACs) Recruit Parkin to Defective Mitochondria to Promote Mitochondrial Autophagy. *J. Biol. Chem.* 287, 40652–40660. doi:10.1074/jbc.M112.419721
- Triplett, J.C., Zhang, Z., Sultana, R., Cai, J., Klein, J.B., Büeler, H., Butterfield, D.A., 2015. Quantitative expression proteomics and phosphoproteomics profile of brain from PINK1 knockout mice: insights

- into mechanisms of familial Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 133, 750–765. doi:10.1111/jnc.13039
- Uversky, V.N., Li, J., Fink, A.L., 2001. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J. Biol. Chem.* 276, 44284–44296. doi:10.1074/jbc.M105343200
- Vaughn, A.E., Deshmukh, M., 2008. Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. *Nat. Cell Biol.* 10, 1477–1483. doi:10.1038/ncb1807
- Weinreb, O., Mandel, S., Youdim, M.B.H., Amit, T., 2013. Targeting dysregulation of brain iron homeostasis in Parkinson's disease by iron chelators. *Free Radic. Biol. Med.* 62, 52–64. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.017
- Wen-Sheng, W., 2006. Protein kinase C alpha trigger Ras and Raf-independent MEK/ERK activation for TPA-induced growth inhibition of human hepatoma cell HepG2. *Cancer Lett.* 239, 27–35. doi:10.1016/j.canlet.2005.07.034
- Wersinger, C., Chen, J., Sidhu, A., 2004. Bimodal induction of dopamine-mediated striatal neurotoxicity is mediated through both activation of D1 dopamine receptors and autoxidation. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 124–137. doi:10.1016/j.mcn.2003.10.002
- Yagoda, N., von Rechenberg, M., Zaganjor, E., Bauer, A.J., Yang, W.S., Fridman, D.J., Wolpaw, A.J., Smukste, I., Peltier, J.M., Boniface, J.J., Smith, R., Lessnick, S.L., Sahasrabudhe, S., Stockwell, B.R., 2007. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-

- dependent anion channels. *Nature* 447, 864–868.  
doi:10.1038/nature05859
- Yang, W.S., SriRamaratnam, R., Welsch, M.E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V.S., Cheah, J.H., Clemons, P.A., Shamji, A.F., Clish, C.B., Brown, L.M., Girotti, A.W., Cornish, V.W., Schreiber, S.L., Stockwell, B.R., 2014. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell* 156, 317–331. doi:10.1016/j.cell.2013.12.010
- Yoo, S.-E., Chen, L., Na, R., Liu, Y., Rios, C., Van Remmen, H., Richardson, A., Ran, Q., 2012. Gpx4 ablation in adult mice results in a lethal phenotype accompanied by neuronal loss in brain. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1820–1827. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.043
- Youdim, M.B.H., Riederer, P.F., 2004. A review of the mechanisms and role of monoamine oxidase inhibitors in Parkinson's disease. *Neurology* 63, S32–35.
- Zeevalk, G.D., Razmpour, R., Bernard, L.P., 2008. Glutathione and Parkinson's disease: Is this the elephant in the room? *Biomed. Pharmacother.* 62, 236–249. doi:10.1016/j.biopha.2008.01.017
- Zhang, H.-M., Su, Q., 2014. PKC in developmental hypothyroid rat brain. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 35, 1161–1166. doi:10.1007/s10072-014-1716-6

## Figure legends

**Figure 1: Ferroptosis and LUHMES cells death.** Results are given as the mean and SEM from at least three independent experiments. **(A)** Dose response of the effect of 24h treatment with erastin, rapamycin or staurosporin on cell viability measure by flow cytometry with PI. **(B)** Measure of the cytosolic, lipidic and mitochondrial oxydative stress, following 24h of erastin treatment, by flow cytometry respectively with HE, C-11 Bodipy and MitoSox. **(C)** Dose response of the effect of 24h treatment with a range of erastin on cell viability measure by MTS test. **(D)** Time-dependant effect of a unique dose of erastin (1,25  $\mu$ M) on viability of LUHMES cells measure by MTS test. **(E)** Changes in total glutathione content were measured after 24h treatment of erastin and normalized to the control. Data are expressed as means  $\pm$  SEM of quadruplicate samples. **(F)** Biochemical inhibition of ferroptosis. All inhibitors were added in pretreatment 1h before erastin (1,25  $\mu$ M). Fer-1 (100 nM), Chloroquine (CQ; 100  $\mu$ M), Acetylcystéine (NAC; 10mM), Deferiprone (DFP; 100  $\mu$ M). **(G)** Neurotoxins and ferroptosis inhibition. Effect of Fer-1 and DFP on 24h treatment of erastin (1,25  $\mu$ M), BS (100  $\mu$ M), ME (100  $\mu$ M), NEM (16  $\mu$ M), DA (80  $\mu$ M), hydroxydopamine (6-OHDA; 30mM) and Paraquat (PQ; 4 $\mu$ M). **(H)** Effect of dopamine (0,2  $\mu$ M) and combination of dopamine and deferiprone after 15h treatment of erastin on cell viability. *NS* refers to no significant; \* refers to  $P < 0,05$ ; \*\* refers to  $P < 0,01$ ; \*\*\* refers to  $P < 0,001$ ; \*\*\*\* and # refers to  $P < 0,0001$ .

**Figure 2: Erastin's targets and GPX4 expression measured by real time RT-PCR.** **(A)** Expression of the three isoforms of VDACs on LUHMES. **(B)** Relative expression of the three isoforms of VDACs in LUHMES (relative to VDAC2). **(C)** Expression of the mRNA encoding for system L (SLC7A5/SLC3A2) and system X<sub>c</sub><sup>-</sup> (SLC3A2/SLC7A11) on LUHMES. **(D)** Expression of the three isoforms of VDACs, system L, system X<sub>c</sub><sup>-</sup>, GPX4 and TH on human brains biopsies (PFC for prefrontal cortex, CO for occipital cortex, SN for substantia nigra and STR for striatum) from 3 "healthy" patients (NP) and from 3 Parkinsonians (P) patients. **(E)** Expression of VDACs, system L, system X<sub>c</sub><sup>-</sup> in SN relative to

TH levels. *NS* refers to not significant *P*-values ( $P > 0,05$ ) ; \* refers to  $P < 0,05$ ; \*\* refers to  $P < 0,01$ ; \*\*\* refers to  $P < 0,001$  and \*\*\*\* refers to  $P < 0,0001$ .

**Figure 3: Inhibition of the toxic effect of MPTP by Fer-1.** Mice treated (or not) with MPTP ( $n = 10$  per group) received 2,5mM of Fer-1 by i.c.v. Mean and SEM are presented. **(A)** Locomotor Activity (measured in a 10-min actimetry test). Measure of mean speed (cm/s), distance travelled (cm) and number of rearing. **(B,C)** Immunohistochemistry of tyrosine hydroxylase (TH)-stained in substantia nigra (SN) and striatum (STR). Cell count of positive TH neurons in the SN by stereology **(B)** and the optic density of STR **(C)**. \* refers to  $P < 0,05$ ; \*\* refers to  $P < 0,01$ ; \*\*\*\* refers to  $P < 0,0001$ .

**Figure 4: PKC regulates ferroptosis.** Results are given as the mean and SEM of at least three independent experiments. **(A)** Inhibition of ferroptosis by 1h pre-treatment with protein kinase inhibitors. iFlt3 (10  $\mu$ M), iPI3k (5  $\mu$ M), iPKC (1  $\mu$ M) on a dose response of erastin. **(B)** Effect on LUHMES survival of BisIII (1  $\mu$ M) without pretreatment with BisIII (1  $\mu$ M). **(C)** Immunoblot with antibodies directed against PKC (10mM), DFP; (100  $\mu$ M) and phospho PKC (5  $\mu$ M) and phospho PKC (10mM), DFP; (100  $\mu$ M) and BisIII (1  $\mu$ M) and BisIII (1  $\mu$ M) treatment with erastin (1,25  $\mu$ M). **(D)** Effect on LUHMES survival of siRNA directed against the 3 isoform of PKC. Scramble is an empty vector and is used as control. **(E)** Expression of the three isoform of the PKC measured by real time RT-PCR. **(F)** Immunoblot with antibodies directed against PKC (10mM), DFP; (100  $\mu$ M) and phospho PKC (5  $\mu$ M) and phospho PKC (10mM), DFP; (100  $\mu$ M) and BisIII (1  $\mu$ M) and BisIII (1  $\mu$ M) treatment with erastin (1,25  $\mu$ M). **(G)** Immunoblot with antibodies directed against PKC (10mM), DFP; (100  $\mu$ M) and phospho PKC (5  $\mu$ M) and phospho PKC (10mM), DFP; (100  $\mu$ M) and BisIII (1  $\mu$ M) and BisIII (1  $\mu$ M) treatment with erastin (1,25  $\mu$ M). **(H)** Organotypic slices cultures treated by erastin (5  $\mu$ M), MPP<sup>+</sup> (30  $\mu$ M), BisIII, Fer1 or a combination of these drugs. On the upper left, the vision in bright field from control (CO) allows to delimitate STR. \* refers to  $P < 0,05$ ; \*\* refers to  $P < 0,01$ ; \*\*\* refers to  $P < 0,001$  and \*\*\*\* or # refers to  $P < 0,0001$ .

Figure 1

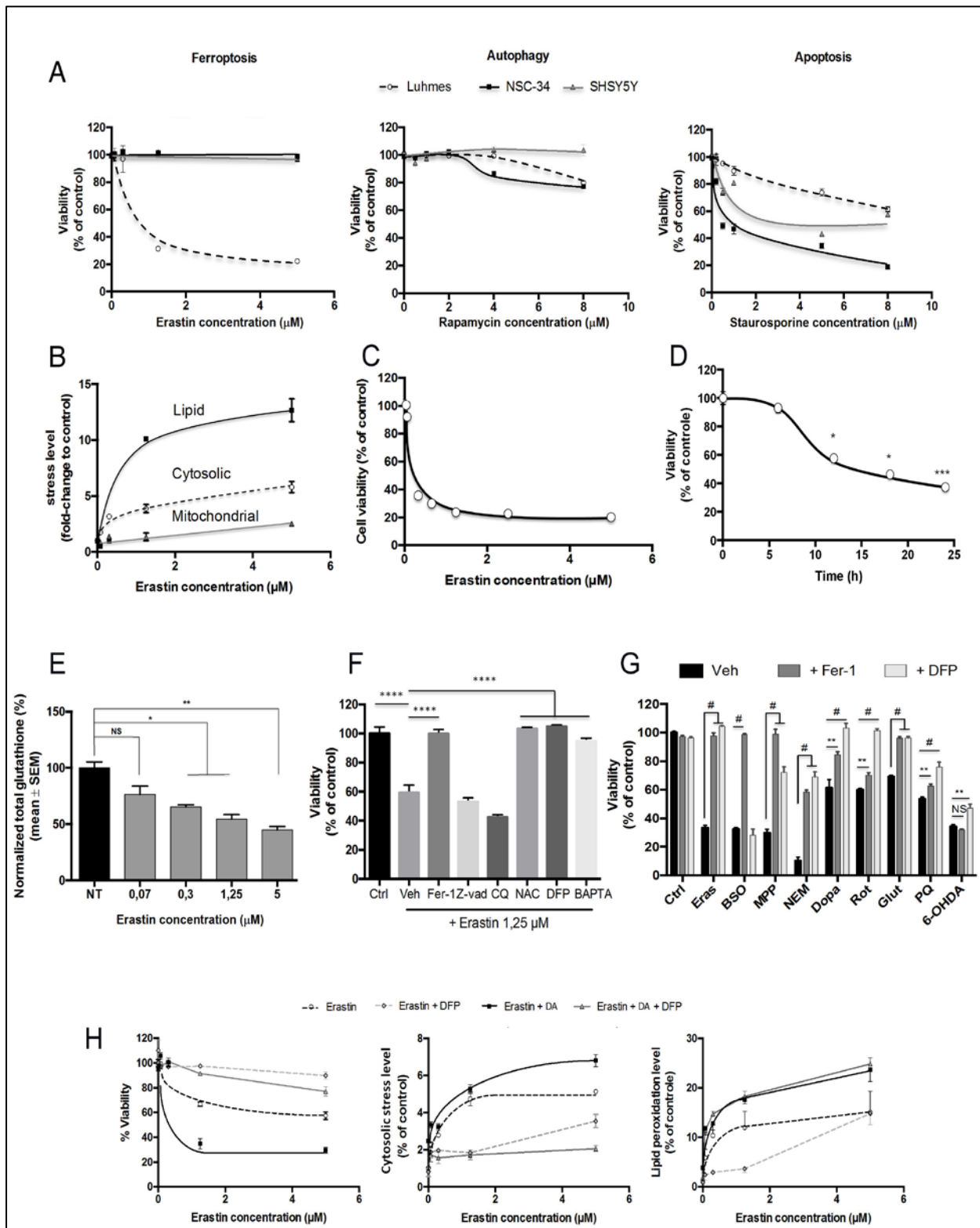


Figure 2

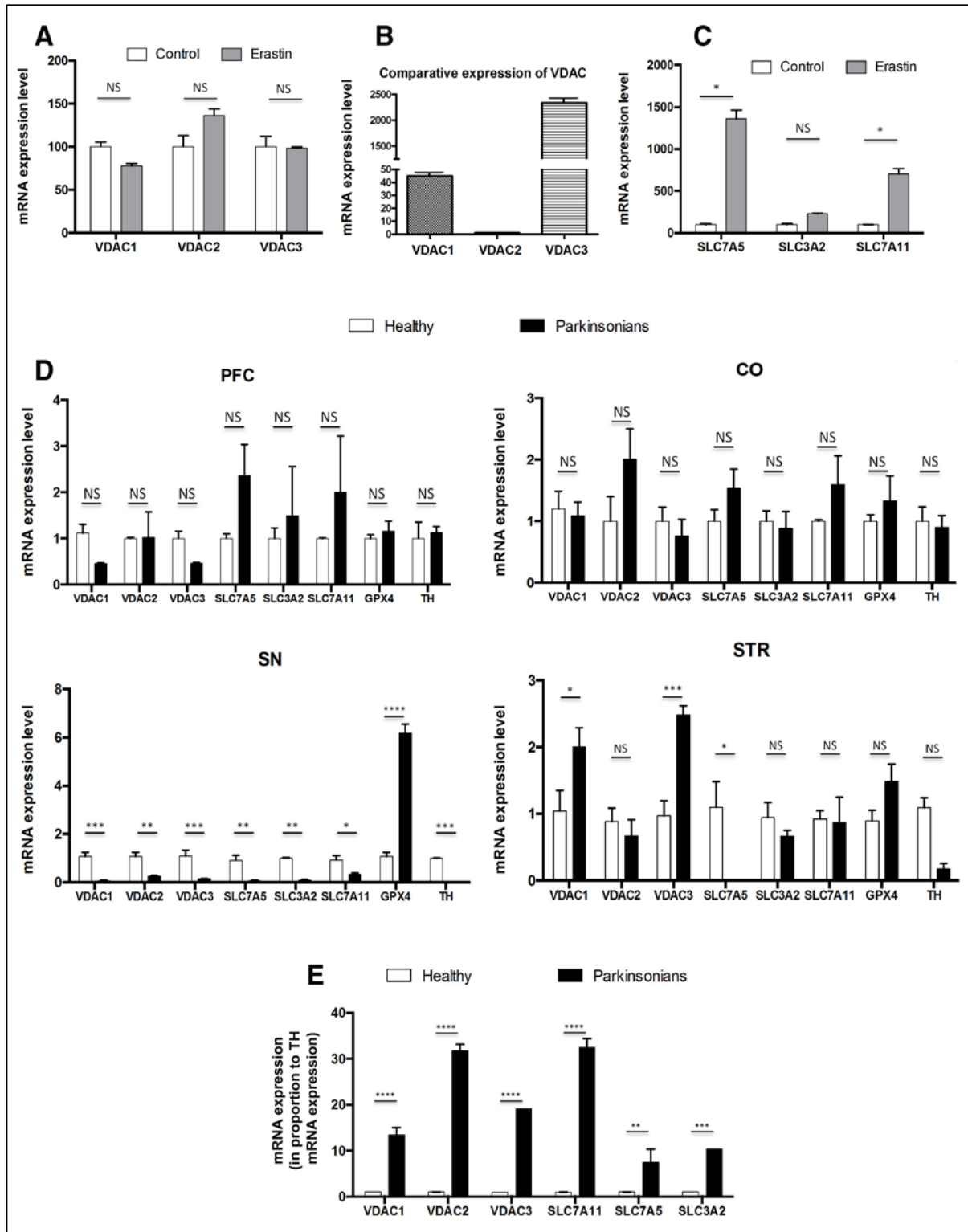




Figure 3

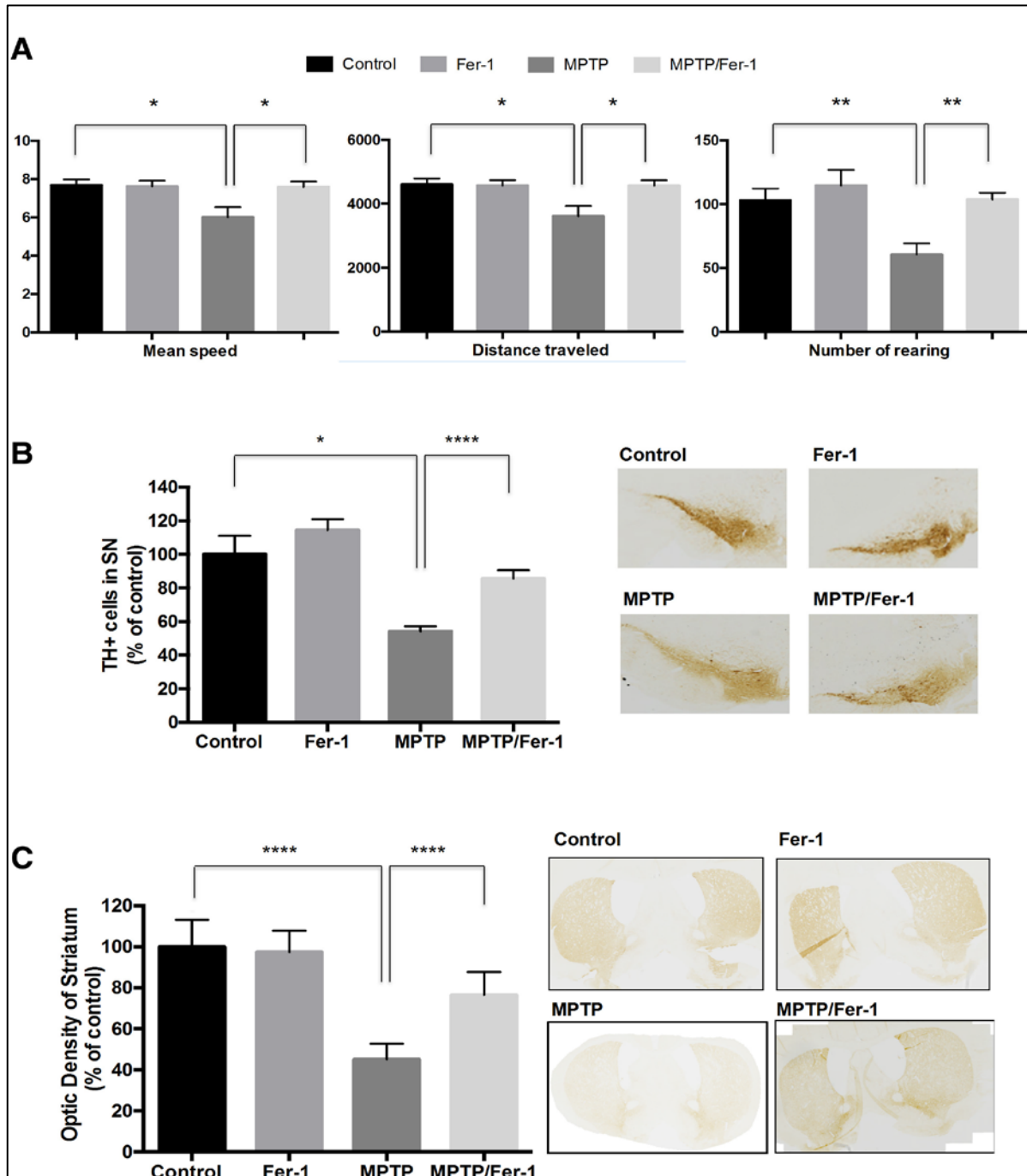
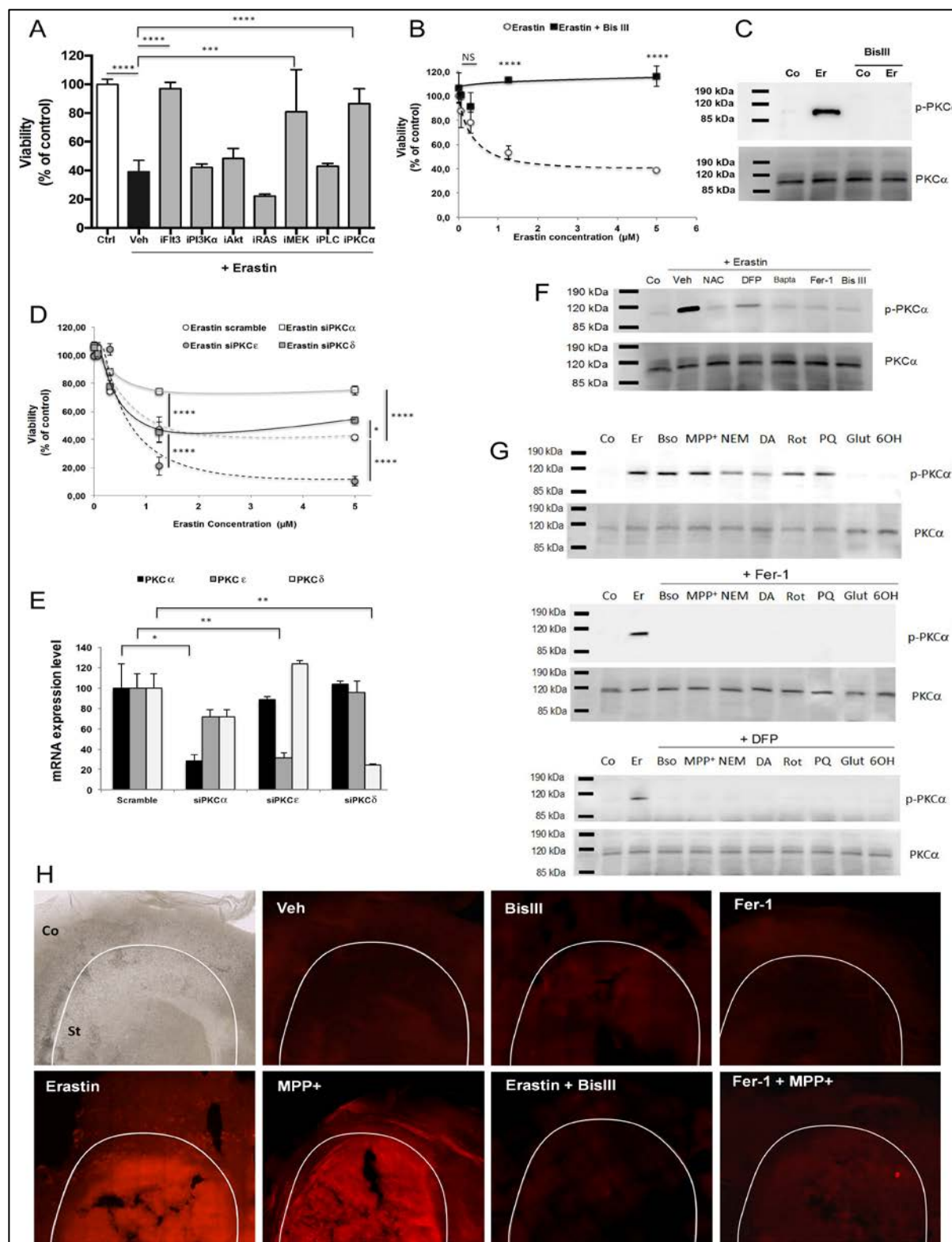


Figure 4



# **PERSPECTIVES**

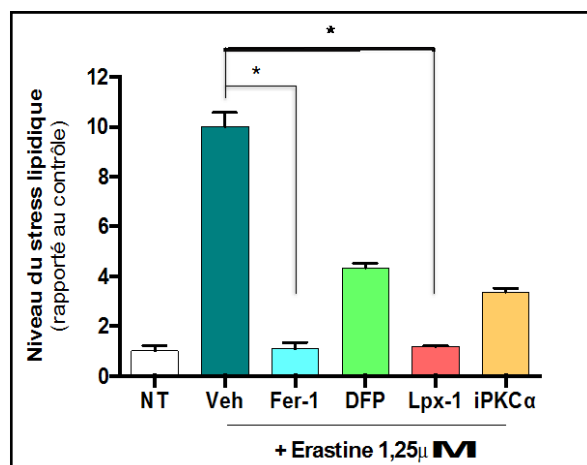
## I. Vers un traitement combiné

Nous avons étudié, sur les cellules LUHMES, le mécanisme d'action de ces quatre inhibiteurs sur la ferroptose, en observant leur effet sur la peroxydation lipidique, le pool de glutathion mais également sur la quantité de fer intracellulaire.

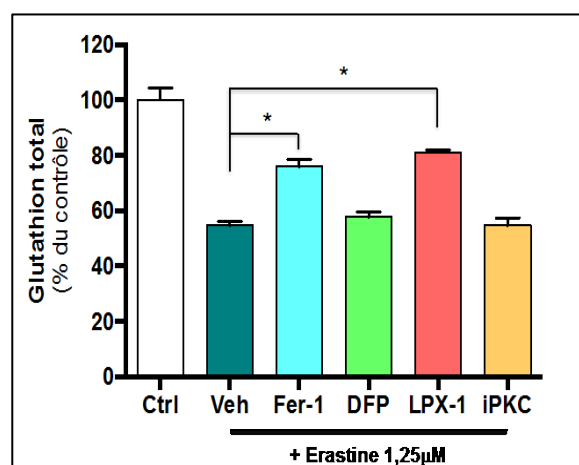
Les cellules LUHMES ont donc été prétraitées, pendant 1 heure, soit avec Fer-1 (5 $\mu$ M), Lpx-1 (5 $\mu$ M), DFP (100 $\mu$ M) ou Bis III (iPKC, 1 $\mu$ M) avant d'être traitées avec une dose d'érastine (1,25 $\mu$ M).

La **figure 65A** montre que seul les inhibiteurs spécifiques de la ferroptose diminuent significativement la peroxydation lipidique puisqu'après traitement, Fer-1 et Lpx-1 ramènent la cellule à un état basal de stress oxydant lipidique. Cette diminution est directement corrélée avec les dosages de GSH puisque seul Fer-1 (+20%,  $p < 0,05$ ) et Lpx-1 (+25%,  $p < 0,05$ ), sont capables de contrer la diminution du pool de glutathion induite par l'érastine (**Figure 66**). Ces résultats ne sont pas forcément étonnant puisque ces inhibiteurs ont été découverts spécifiquement pour lutter contre la peroxydation lipidique par leur action sur la glutathion peroxydase 4.

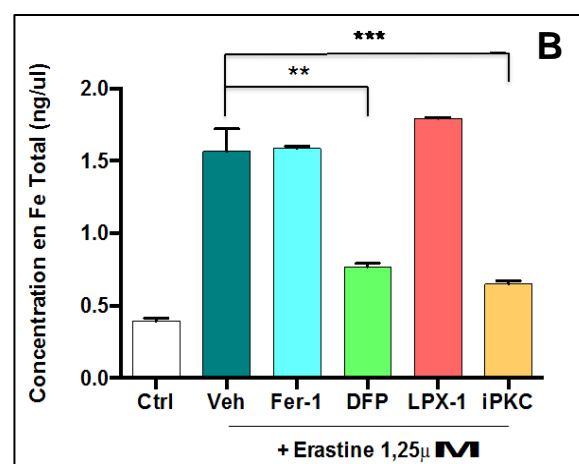
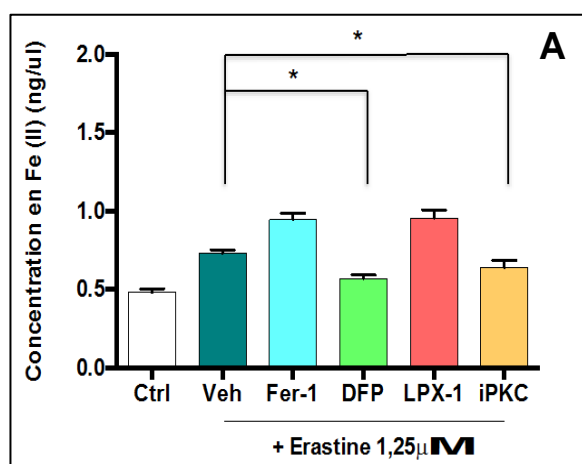
Lorsqu'on mesure la concentration en fer des LUHMES après traitement avec les différents inhibiteurs, il n'est pas étonnant de voir la déféripone diminuer ce pool de fer augmenté par l'érastine. Cependant il est intéressant d'observer que l'inhibiteur de la PKC est également capable de contrer les effets de l'érastine sur la concentration en fer (**Figure 67A et B**).



**Figure 65 : Effets des inhibiteurs de la ferroptose sur la peroxydation lipidique des cellules LUHMES traitées avec une dose d'érastine (1,25mM). \*p<0,05 ; n=3**



**Figure 66 : Dosage du glutathion total dans les cellules LUHMES après traitement avec une gamme d'érastine. \*p<0,05 ; n=3**



**Figure 67 : Dosage du fer ferreux (A) et du fer total (B) dans les cellules LUHMES prétraitées avec des inhibiteurs de la ferroptose. \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; n=3**

Dans ce travail de thèse, nous avons pu tester et montrer, dans un modèle *in vivo* que la ferrostatine-1, la liproxstatine-1 et l'UCN-01 sont capables de contrer partiellement les effets du MPTP sur l'activité locomotrice des souris et sur la dégénérescence de la voie nigro-striée induite par le MPTP.

Le seul inhibiteur de la ferroptose que nous n'avons pas testé, de cette manière, dans notre étude est le chélateur de fer, la défériprone. Cependant, des travaux précédents de notre laboratoire ont clairement montré que l'administration orale de la DFP à des souris MPTP améliore l'activité locomotrice de ces souris et protège les neurones dopaminergiques (Devos et al., 2013).

Nous avons testé ces différents inhibiteurs séparément, cependant leurs différences d'action pour contrer la ferroptose nous pousse à envisager un possible traitement combiné de ces différents agents pour lutter contre tous les aspects de cette mort cellulaire.

Dans ce cas, la lipoxstatine-1, liposoluble et pouvant être administrée par voie intranasale, serait privilégiée par rapport à la ferrostine-1 pour lutter contre la peroxydation lipidique et le pool de glutathion perturbé lors de la ferroptose.

Cet inhibiteur pourrait être associé à la déféprone qui peut facilement s'administrer par voie orale pour lutter contre le versant « homéostasie du fer » de la ferroptose ou associé à l'inhibiteur de PKC. La molécule que nous avons utilisée a déjà fait l'objet d'essai clinique pour lutter contre certain cancer et de ce fait sa "safety" a déjà été mesurée.

## II. La ferroptose dans un modèle de synucléinopathie

L' $\alpha$ -synucléine est le composant principal des corps de Lewy, marqueurs spécifiques de la MP. La mise en évidence de mutations ponctuelles de l' $\alpha$ -synucléine associées à de rares formes héréditaires de la MP a permis d'évoquer un rôle de cette protéine dans la physiopathologie de la maladie. Trois mutations ponctuelles ont été identifiées à ce jour: A53T, A30P et E46K (Giráldez-Pérez et al., 2014). Il a été rapporté que la duplication ou la triplication du gène codant l' $\alpha$ -synucléine est suffisante pour provoquer la MP, ce qui suggère que le niveau d'expression de cette protéine est un facteur déterminant de la progression de la MP. En s'accumulant, l' $\alpha$ -synucléine peut entraîner la mort cellulaire et joue donc un rôle essentiel dans le mécanisme de neurodégénérescence. Cette toxicité, induite par l'accumulation d' $\alpha$ -synucléine est caractérisée par un dysfonctionnement mitochondrial (inhibition du complexe I) et par un stress oxydatif (Banerjee et al., 2009).

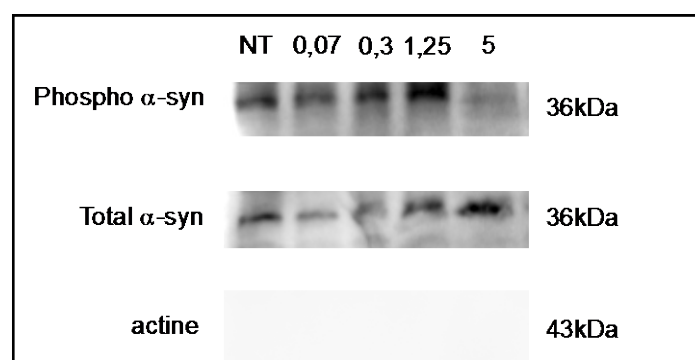
Beaucoup d'études ont montré un lien entre les espèces oligomères toxiques de l' $\alpha$ -synucléine et le fer. Dans les corps de Lewy, l' $\alpha$ -synucléine est principalement phosphorylée, ce qui suggère que cette phosphorylation est un processus pathologique. La phosphorylation de la sérine 129 de l' $\alpha$ -synucléine augmente son affinité pour le fer (Bisaglia et al., 2009).

Il a été montré que le fer peut induire la conversion de la structure en hélice- $\alpha$  d' $\alpha$ -synucléine vers la conformation en feuillet- $\beta$  caractéristique des corps de Lewy présents dans la substance noire (SN) des patients parkinsonien (Uversky et al., 2001a). De plus, le fer en présence de dopamine et de  $H_2O_2$ , provoque l'agrégation de l' $\alpha$ -synucléine favorisant ainsi la formation des corps de Lewy (Castellani et al., 2000) et lorsque l' $\alpha$ -synucléine est surexprimée, le fer va augmenter la production de ROS (Ostrerova-Golts et al., 2000).

En plus de ces relations fer/alpha-synucléine, il existe également des relations dangereuses entre l'agrégation de l'alpha-synucléine et le métabolisme de la dopamine. Par exemple, la présence d' $\alpha$ -synucléine dans les terminaisons des neurones dopaminergiques peut provoquer une séquestration défectueuse de la dopamine dans les vésicules, ce qui conduit à un métabolisme oxydatif accru de la dopamine et la formation de dopamine quinone toxique (Sidhu et al., 2004).

Considérant ces nombreux liens entre synucléinoathie et le fer et considérant le fait qu'elle soit essentielle dans la Maladie de Parkinson, il serait intéressant de montrer s'il existe un lien entre la ferroptose et la synucléinopathie.

Dans un premier temps, pour tenter d'établir ce lien, nous avons, par Western-Blot, détecté l' $\alpha$ -synucléine dans les cellules LUHMES traitée par une gamme d'éristine. Sur ce blot (**Figure 68**), on observe qu'en fonction de la concentration d'éristine, la forme phosphorylée de l' $\alpha$ -synucléine, considérée comme la forme qui aura tendance à s'aggréger, augmente. On remarque également que dans nos cellules, nous n'arrivons à détecter que des formes dimériques de l' $\alpha$ -synucléine. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que nos cellules contiennent beaucoup de dopamine et de fer qui augmentent la formation d'agrégats.



**Figure 68 : Détection de l' $\alpha$ -synucléine dans les cellules LUHMES traitées avec une gamme d'éristine.**

Ce premier résultat conforte l'idée d'un possible lien entre synucléinopathie et la ferroptose. Il sera donc intéressant de poursuivre l'étude de cette hypothèse.

D'abord dans notre modèle cellulaire LUHMES, nous pourrions introduire par lipofection, de façon stable, une  $\alpha$ -synucléine portant la mutation A53T pour induire une surexpression de cette protéine dans les cellules.

Toutes les caractéristiques de la ferroptose pourraient être étudiées notamment l'élévation de la peroxydation lipidique, l'impact sur le contenu en glutathion, en fer et ainsi tenter de caractériser la mort par ferroptose qui pourrait être induite par l'augmentation de l'expression d' $\alpha$ -synucléine.

*In vivo*, ce lien pourrait être étudié mais le modèle MPTP ne serait pas pertinent. En effet, bien qu'il ait l'avantage de récapituler un certain nombre de critères neuropathologiques caractéristiques de la maladie humaine (en particulier la mort neuronale, les processus neuroinflammatoires et la réaction gliale associée), il ne reproduit pas la synucléinopathie.

Chez la souris et le rat, l'expression ciblée de l' $\alpha$ -synucléine humaine dans tous les neurones induit l'apparition d'inclusions riches en  $\alpha$ -synucléine dans le cerveau des animaux mutants. L'obtention des modèles transgéniques se fait par transfert du gène de l' $\alpha$ -synucléine, possédant le plus souvent la mutation A53T, dans les cellules cibles grâce à l'utilisation de vecteurs dont les plus utilisés sont les adénovirus (AAV).

Ces modèles présentent la gamme complète des mécanismes physiopathologiques qui est observée chez l'homme, y compris l'agrégation d' $\alpha$ -synucléine en fibrilles, la phosphorylation et l'ubiquitination de l' $\alpha$ -synucléine et une progression de la neurodégénérescence dépendante de l'âge (Bourdenx et al., 2015; Engeln et al., 2013; Van der Perren et al., 2015). Sur ce modèle transgénique nous pourrions tester les différents inhibiteurs de la ferroptose (Lpx-1, DFP, UCN-01) sur la dégénérescence nigro-striée progressive induite par la sur-expression de l' $\alpha$ -synucléine.

### **III. Etude du lien entre l'hypoxie et la ferroptose**

Lors de ce travail de thèse, la ferroptose était observée à la suite d'un traitement avec un inducteur chimique (érasitine). Il serait intéressant de montrer que cette mort cellulaire peut être enclenchée lors de processus physiopathologique. De nombreuses analogies ont été faites entre la ferroptose et l'excitotoxicité du glutamate appelé aussi oxytose. Le glutamate est capable d'inhiber le système de transport de la cystine (Xc-), sa toxicité peut-être contrée par un chélateur de fer et il a été montré que l'oxytose peut-être contrée par la ferrostatine-1 dans des cultures organotypiques d'hippocampe. Cette oxytose est impliquée dans un très grand nombre de pathologies neurologiques dont l'épilepsie et les accidents vasculaires cérébraux de type ischémiques. Ces derniers sont caractérisés par une hypoxie d'une région du cerveau due à l'obstruction d'un vaisseau.



La thématique de notre laboratoire porte sur l'étude de la physiopathologie et de la pharmacologie des troubles cognitifs dégénératifs et vasculaires.

De nombreux liens ont été observés entre les troubles vasculaires et les troubles neurodégénératifs, les premiers pouvant accélérer l'apparition des seconds. Quelques données de la littérature ont montré un possible lien entre l'hypoxie induit par une ischémie et la ferroptose mais ce lien n'est pas encore tout à fait établi et reste flou. Cependant, cette hypothèse semble être une perspective intéressante au vue de l'impact de l'hypoxie dans une large gamme de pathologie.

L'objectif de ces différentes expérimentations préliminaires est de tenter d'établir un lien entre l'hypoxie et la ferroptose au niveau cellulaire. Il a donc fallu, dans un premier temps, mettre au point les conditions d'hypoxie optimale pour pouvoir étudier la ferroptose et pouvoir ensuite essayer de contrer l'hypoxie. En se basant sur des données de la littérature et sur nos toutes premières expérimentations d'hypoxie, nous avons choisi un taux d'oxygène de 1%.

## 1. Mise au point des conditions d'hypoxie

Nous avons commencé par réaliser une cinétique d'action de l'hypoxie sur la viabilité cellulaire des LUHMES. La **figure 69A** nous apprend qu'il faut un minimum de 8 heures d'hypoxie pour engendrer une mortalité significative (-20%,  $p < 0,05$ ) sur les cellules LUHMES. Cette mortalité atteint 40% ( $p < 0,05$ ) à 16 heures d'hypoxie et 50% ( $p < 0,05$ ) à 24 heures d'hypoxie. La mortalité due à l'hypoxie est liée à une très forte augmentation du stress oxydant cytosolique car dès 8 heures il est 4,4 fois plus élevé ( $p < 0,05$ ) que les cellules non traitées. Mais il semble atteindre un plateau puisque le fait d'augmenter la durée d'hypoxie n'augmente pas plus le stress cytosolique des cellules (**Figure 69B**).

Sans oublier l'objectif principal qui est de pouvoir lier l'hypoxie à la ferroptose, l'un des critères de choix de la condition optimale de la durée d'hypoxie est l'augmentation du stress lipidique, caractéristique de la mort cellulaire par ferroptose.

Nous avons donc mesuré ce stress lipidique lors de la cinétique d'hypoxie réalisé sur les cellules LUHMES et la **figure 69C** nous montre clairement que seul le temps 24 heures augmente de façon significative (+ 5,7 fois,  $p < 0,05$ ) la peroxydation lipidique. La mortalité de 60% associé à l'augmentation du stress lipidique d'un facteur 5,7 nous ont permis de choisir le temps 24 heures d'hypoxie pour la suite des expérimentations.

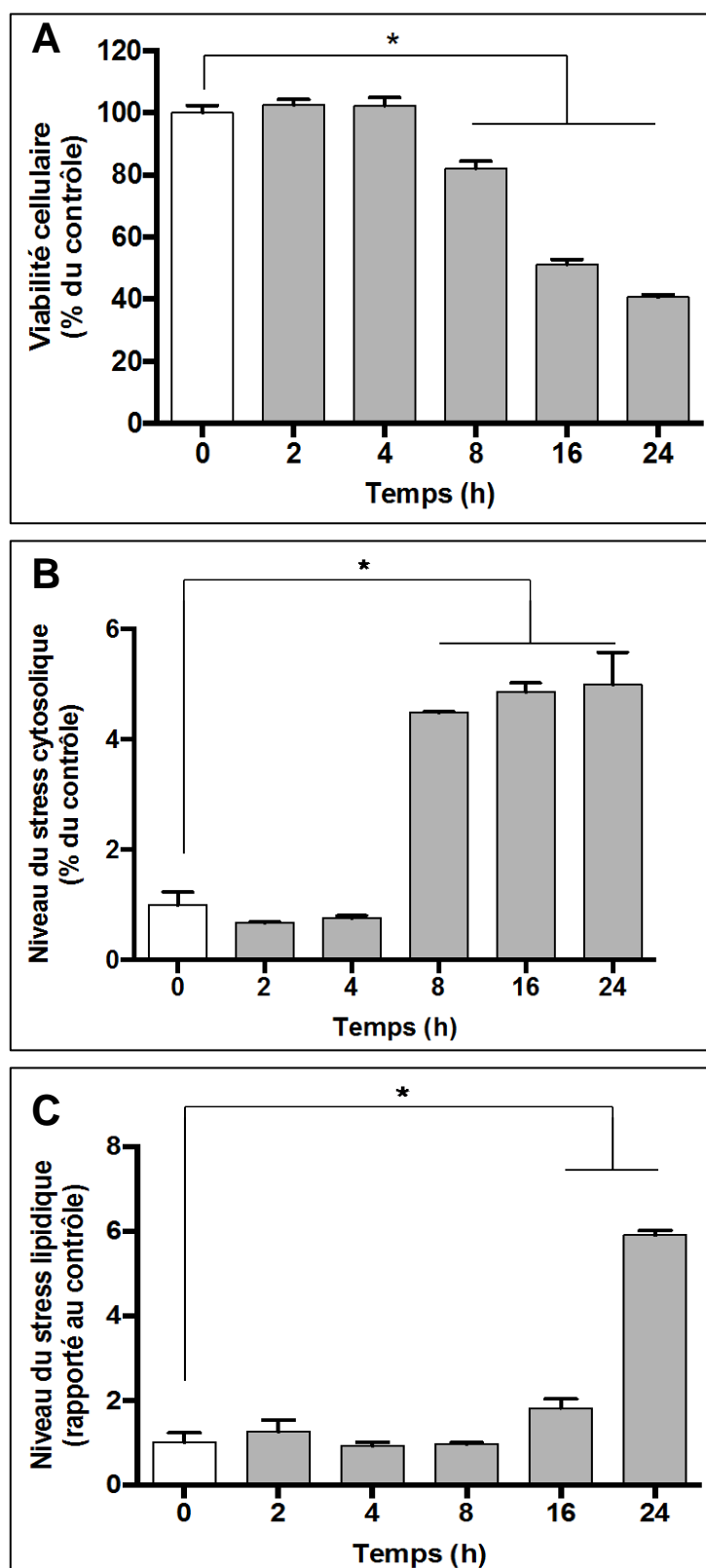


Figure 69 : Effet d'une cinétique d'hypoxie sur la (A) viabilité, (B) le stress oxydant cytosolique et (C) la peroxydation lipidique des cellules LUHMES. \* $p < 0,05$  ;  $n = 2$

## 2. Effet des inhibiteurs de la ferroptose sur l'hypoxie

Pour pouvoir établir un lien entre ferroptose et l'hypoxie nous avons prétraité les cellules LUHMES avec tous les agents pharmacologiques de notre étude qui ont montré un effet protecteur vis-à-vis de la ferroptose. A ces inhibiteurs, nous avons ajouté les inhibiteurs de l'autophagie et de l'apoptose. Les cellules ont ensuite été mises en hypoxie pendant 24 heures puis nous avons mesuré la viabilité cellulaire par cytométrie de flux ainsi que le stress oxydant cytosolique et lipidique.

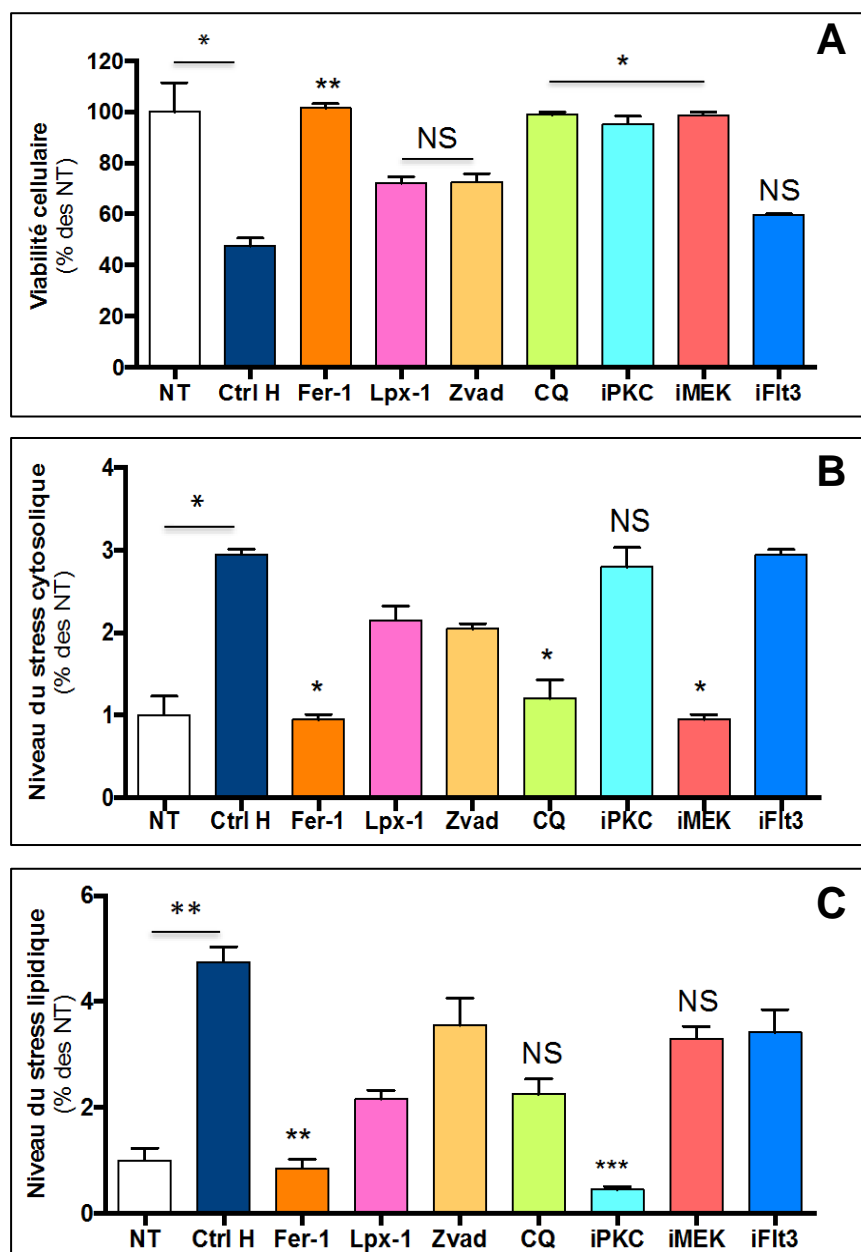


Figure 70 : Effet des inhibiteurs de la ferroptose, de l'autophagie et de l'apoptose sur (A) la viabilité, (B) le stress cytosolique et (C) le stress lipidique des cellules LUHMES mise en hypoxie pendant 24 heures. NS, non significatif, \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$  ;  $n=2$

Les résultats de la **figure 70A** montre qu'une hypoxie de 24 heures tue 55% des cellules LUHMES ( $p < 0,05$ ). Quatre inhibiteurs sont capables de contrecarrer complètement les effets de l'hypoxie, Fer-1 ( $p < 0,01$ ), la chloroquine, l'inhibiteur de PKC et l'inhibiteur de MEK ( $p < 0,05$ ). Mais leurs effets semblent passer par des mécanismes différents car si la ferrostatine-1 est capable de diminuer les deux types de stress, les effets de la chloroquine et de l'inhibiteur de MEK passe par une diminution significative du stress oxydant cytosolique ( $p < 0,05$ ). Tandis que l'inhibiteur de PKC diminue uniquement le stress oxydant lipidique ( $p < 0,001$ ) pour inhiber les effets de l'hypoxie (**Figure 70B et C**).

Ces premiers résultats ont tout d'abord permis la mise en place d'un protocole d'hypoxie qui semble adapté à la lignée cellulaire LUHMES et qui permet d'étudier les voies impliquées dans la mort de ces cellules sous hypoxie.

Dans ces conditions, nous avons observé une importante augmentation du stress oxydant et de la peroxydation lipidique. Un résultat très prometteur est que l'inhibiteur spécifique de la ferroptose, Fer-1 permet clairement de réduire la mortalité de nos cellules misent en hypoxie, sans doute grâce à la réduction de la production de ROS ainsi que la peroxydation lipidique. Ce résultat sur le lien entre ferroptose et hypoxie est conforté par l'action neuroprotectrice de l'iPKC et l'iMEK qui sont deux inhibiteurs efficaces contre la ferroptose comme nous avons pu le montrer dans ce travail de thèse.

Enfin, l'inhibiteur de l'autophagie montre lui aussi une forte capacité de réduire la mortalité sous hypoxie, ce résultat n'est pas si suprenant puisque nous savons que l'augmentation du stress lipidique peut engendrer une mitophagie par le biais du senseur qu'est le réticulum endoplasmique. Ainsi, si nous pouvons raisonnablement conclure que la ferroptose était bien impliquée dans la mort induite par l'hypoxie, elle ne doit donc pas être la seule cause de l'augmentation de la mortalité cellulaire.

Cependant, l'implication de la ferroptose dans les phénomènes d'hypoxie nous permettrait de faire un lien avec les troubles vasculaires, tels que les accidents vasculaires cérébraux (AVC) où l'hypoxie est un facteur clé de leur physiopathologie.

Avant d'envisager d'autres expérimentations, il faudra dans un premier temps vérifier ces premiers résultats. Ensuite, il serait envisageable de réaliser des études complémentaires sur des coupes organotypiques ou sur des animaux placés en conditions d'hypoxie. Bien que difficile à mettre en œuvre, le laboratoire possède tout le matériel nécessaire pour le réaliser, cela serait un outil puissant pour valider notre hypothèse et un support plus qu'intéressant pour la recherche de thérapie face aux diverses pathologies associées à une diminution d'oxygène dans le cerveau.

# **CONCLUSION**

## **GENERALE**

Depuis le début des années 90 et les travaux de Dipasquale et al. sur le MPP+, l'apoptose fut considéré comme la mort cellulaire principale des neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson (Dipasquale et al., 1991). Cependant de nombreuses études post-mortem ont alimenté la controverse sur la réelle implication de l'apoptose dans la mort des neurones dopaminergique des patients parkinsoniens, certaines appuyant cette hypothèse (Anglade et al., 1997), d'autres la réfutant (Wüllner et al., 1999b).

Par la suite, la controverse autour de l'apoptose mais également l'avancée de la compréhension des mécanismes de l'autophagie ont permis à de nombreuses études de mettre en évidence l'implication de l'autophagie dans la mort cellulaire des neurones dopaminergiques. Un fois encore, le caractère neuroprotecteur (Banerjee et al., 2010) ou délétère (Stefanis et al., 2001) de l'autophagie à depuis était débattue.

Le terme nécrose a été traditionnellement utilisé pour décrire une forme accidentelle de la mort cellulaire, résultant généralement d'un dommage direct à la membrane cellulaire. Cependant, au cours des 10 ou 15 dernières années, de nombreuses données ont montré que la nécrose (ou au moins certaines formes de nécrose) peut également être génétiquement programmée. Ce type de mort cellulaire n'a malheureusement pas reçu la même attention que l'apoptose et est donc beaucoup moins bien compris.

Comme je l'ai décrit dès l'introduction de ce manuscrit, parmi les formes de nécrose régulées notre attention s'est portée sur la ferroptose clairement identifiée et très bien décrite par Dixon et al. en 2012 alors que je débutais ma thèse.

Débutant notre travail sur un très beau modèle de cellules dopaminergiques en culture développé par l'équipe du Pr Leist, nous avons démontré que les principales caractéristiques de la ferroptose sont retrouvées dans les LUHMES. Nous avons également observés que les antioxydants, chélateur de fer ou les inhibiteurs spécifiques de la ferroptose sont capables d'inhiber cette mort cellulaire comme cela avait été décrit dans les cellules cancéreuses. Nos résultats ont également montré que ces inhibiteurs spécifiques de la ferroptose peuvent contrecarrer les effets délétères des drogues couramment utilisées dans les travaux qui étudient les mécanismes physiopathologiques de la maladie de Parkinson telles que le paraquat, la roténone ou le MPP+. Résultats confirmant que ces drogues peuvent induire la ferroptose et un possible rôle mitochondrial dans ce type de mort cellulaire programmé (MPP+, roténone et paraquat agissant sur le complexe I mitochondrial).

De part leurs fonctions dans l'organisme, de nombreux types cellulaires sont hyper-spécialisés. Il n'est donc pas surprenant que les spécificités des neurones dopaminergiques se traduisent par une sensibilité toute particulière à cette forme de mort découverte pour lutter contre des cellules cancéreuses. De même il semblait intéressant d'étudier si les neurones dopaminergiques présentaient des voies de régulations spécifiques de cette ferroptose. Ainsi nos études ont mis en évidence un lien tout particulier entre la ferroptose et calcium intracellulaire et entre ferroptose et PKCalpha. D'ailleurs, au vu des nombreux éléments de la littérature et des similitudes d'action entre la ferroptose et l'oxytose, il serait intéressant de montrer si un lien existe entre l'hypoxie, un phénomène physiopathologique impliqué dans de nombreuses pathologies, et la ferroptose. Raisons pour laquelle j'ai commencé à étudier ces possibles liens sur les LUHMES.

Avec la limite des techniques que je pouvais développer ces résultats ont pu être confirmés dans des cultures organotypiques, où l'on a pu observer que l'érastine, tout comme le MPTP tue spécifiquement des neurones dopaminergiques. Ces morts pouvant respectivement être inhibés par un inhibiteur de la PKCalpha et la ferrostatine-1. *In vivo*, sur le modèle de souris MPTP, nous avons pu démontrer que la ferrostatine-1, la liproxstatine-1 et un inhibiteur de PKC sont capables (i) d'améliorer l'activité locomotrice des souris et (ii) de protéger de la dégénérescence nigro-strié induite par le MPTP.

Les résultats obtenus *in vivo* sont très significatifs et sont même assez étonnants quand on pense à la multitude de facteurs entrant en jeu entre l'injection du MPTP et l'analyse post-mortem des animaux. Ils sont d'autre part très encourageants quant à la possibilité de réaliser *in vivo* l'ensemble des expériences qui permettrait d'envisager l'utilisation de ces molécules à titre curatif, voire préventif. En effet, de part la time-line suivie pour ces manipulations (injection de la ferrostatine-1, de la liproxstatine-1 ou de l'inhibiteur de PKC avant l'intoxication) ces drogues ont démontré leur effet neuro-protecteur, mais ont-elles un effet neuro-régénérateur? Une time line où l'intoxication avec le MPTP se ferait avant l'utilisation des drogues qui contrent la ferroptose doit être mise au point. De même les résultats obtenus sur ce modèle nous laissent penser qu'un traitement combiné avec des chélateurs serait plus efficace pour lutter contre tous les aspects de la ferroptose dans les neurones dopaminergiques. Les chélateurs diminuant la quantité de fer et les inhibiteurs de la ferroptose le stress lipidique. L'action de la PKCalpha pouvant être plus polyvalent.

Il serait également intéressant de montrer si un lien peut être fait entre les formes génétiques des maladies de parkinson et la ferroptose. Dans les formes génétiques de maladie de Parkinson les gènes mis en cause sont regroupés sous le terme PARK (PARK 1 à 15). Ces mutations sont bien caractérisées. Certaines sont des mutations ponctuelles autosomiques dominantes couramment retrouvées comme par exemple A53T ou A30P sur le gène SNCA (PARK1) ou encore G2019S sur le gène LRRK2 (PARK8); D'autres sont responsables de formes autosomiques récessives tel que les mutations W453X, ou K161N sur le gène PARKIN (PARK2) et les mutations non sens W437X ou R246X sur le gène PINK1 (PARK6). La transfection de neuroblastomes par les formes dominantes de ces mutations, ou par des constructions permettant d'éteindre l'expression de ces gènes (comme l'emploi de siRNA ou miRNA) a permis de retrouver, au niveau cellulaire, les phénotypes observés sur les cellules dopaminergiques des patients. Nombre de ces études ont d'ailleurs permis d'identifier le rôle ou le mode d'action de ces gènes et de leurs mutations.

La lipofection des LUHMES est facilement réalisable et nous savons que les gènes SNCA, LRRK2, PARKIN et PINK1 s'expriment chez les LUHMES. Il serait assez facile d'étudier dans un premier temps les effets de l'activation et de l'inhibition de la ferroptose sur ces LUHMES « génétiquement modifiées ». A cette fin j'ai commencé quelques études préliminaires avec l'alpha-synucléine car il existe déjà des relations entre le métabolisme du fer et synucleinopathie.

Pour conclure, l'ensemble de nos données montre qu'il faudrait dorénavant considérer la ferroptose, comme étant une mort cellulaire très importante dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la maladie de Parkinson. De nombreuses molécules se développent pour étudier la ferroptose mais si les activateurs de la ferroptose peuvent s'avérer très utiles pour leur application en cancérologie, les inhibiteurs de cette ferroptose pourraient trouver leur plein potentiel dans des maladies neurodégénératives et plus particulièrement dans la maladie de Parkinson. Si c'est le cas notre travail aura eu un véritable impact dans la lutte contre les maladies neurodégénérative.



# **ANNEXE**

For Peer Review

erm

**The protective effect of human platelet lysate in models of neurodegenerative disease: involvement of the Akt and MEK pathway**

Flore Gouel<sup>1</sup>, Bruce Do Van<sup>1</sup>, Ming-Li Chou<sup>2</sup>, Aurélie Jonneaux<sup>1</sup>,  
Caroline Moreau<sup>3</sup>, Régis Bordet<sup>1</sup>, Thierry Burnouf<sup>4</sup>, Jean-Christophe  
Devedjian<sup>1,5</sup> and David Devos<sup>1,3\*</sup>

1- *INSERM, UMR\_S1171, Lille Nord de France University, Lille, France*

2- *Graduate Institute of Medical Sciences, College of Medicine, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan*

3- *Department of Movement Disorders and Neurology, CHRU of Lille, France.*

4- *Graduate Institute of Biomedical Materials and Tissue Engineering, College of Biomedical Engineering, Taipei*

5- *University of the Littoral Opal Coast, Calais, France*

\* Corresponding author at : david.devos@chru-lille.fr

**Acknowledgments:** We thank Professor Marcel Leist for providing the LUHMES cell line, Professor Guillaume Garçon for helpful discussions and Dr. David Fraser (Biotech Communication, Damery, France) for editorial assistance. The authors thank the French Ministry of Health for funding PHRC grants; the DN2M regional grant; the French Parkinson's Disease Association and the French charity association ARSLA.

**Abstract**

Neurodegenerative diseases have huge economic and societal impacts, and place an immense emotional burden on patients and caregivers. Given that platelets have an essential physiologic role in wound healing and tissue repair, human platelet lysates (HPLs) are being developed as a novel, effective biotherapy for neurodegenerative diseases. HPLs constitute abundant, readily accessible sources of physiologic mixtures of many growth factors (GFs) with demonstrable effects on neuron survival and thus the development, maintenance, function and plasticity of the vertebrate nervous system. Here, we found that HPLs had marked neuroprotective abilities in cell-based models of Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis (the LUHMES and NSC-34 cell lines, respectively). The HPLs protected against specific cell death pathways (apoptosis and ferroptosis) and specific oxidative stress inducers (MPP<sup>+</sup> and menadione), and always afforded more protection than commonly used recombinant GFs (rGFs). The HPLs' mechanism of protection involved specific signaling pathways: whereas the Akt pathway was activated by HPLs under all conditions, the MEK pathway appeared to be more specifically involved in protection against MPP<sup>+</sup> toxicity in LUHMES and, in a lesser extent, in STS toxicity in NSC-34. Our present results suggest that HPLs-based therapies could be used to prevent neuronal loss in neurodegenerative diseases while overcoming the limitations currently associated with use of rGFs.

Currently available therapeutic approaches for neurodegenerative diseases like Parkinson's disease (PD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) do not prevent neurodegeneration. One novel approach to stimulating neuron survival is based on the use of neurotrophic growth factors. Given that platelets have an essential physiologic role in wound healing and tissue repair, human platelet lysates (HPLs) are being developed as a novel, effective biotherapy for neurodegenerative diseases. HPLs constitute abundant, readily accessible sources of physiologic mixtures of many growth factors (GFs) with demonstrable effects on neuron survival and thus the development, maintenance, function and plasticity of the vertebrate nervous system. In view of the HPLs' neuroprotective properties and our goal of developing a HPL preparation for therapeutic use, we sought to investigate the HPLs' putative protective effects in *in vitro* models of PD and ALS (the Lund human mesencephalic (LUHMES) and NSC-34 cell lines, respectively). LUHMES cells constitute the best available model of post-mitotic dopaminergic neurons (Scholz et al., 2011b), and NSC-34 is the most convenient cell based model of ALS (in comparison to primary motor neuron cultures or iPSC-based models) for such screening studies (Maier et al., 2013). A growing body of evidence indicates that oxidative damage and mitochondrial dysfunction contribute to the cascade of events that leads to neuronal degeneration in PD and ALS (Baron et al., 2007). We therefore decided to test a range of oxidative stress inducers in our experiments on LUHMES and NSC-34 cell lines.

Firstly LUHMES and NSC-34 cells were exposed to specific pro-oxidants and regulated cell death inducers (**Figure 1**). The 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) is classically used to kill dopaminergic neurons (Javitch et al., 1985). Likewise, the menadione also inhibits complex I and rapidly increases intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) in both mitochondria and the cytosol (Monteiro et al.,

2013). In order to determine whether the HPLs' effect was specific for a particular regulated cell death pathway in these cell models, we used erastin to induce ferroptosis (a newly characterized form of regulated cell death featuring the iron-dependent accumulation of lethal lipid ROS, and which is distinct from apoptosis and autophagy) (Dixon et al., 2012b), staurosporine (STS) to induce apoptosis (Bertrand et al., 1994) and rapamycin to induce mTOR-dependent autophagy (Heitman et al., 1991).

In NSC-34 cells, only treatment with STS and menadione were associated with markedly lower viability. Surprisingly, LUHMES cells were most sensitive to erastin (treatment with STS or rapamycin did not modify cell viability) and menadione induced the same level of oxidative stress as MPP<sup>+</sup> but was less efficient to induce cell death. In order to determine whether or not HPLs have a neuroprotective effect, LUHMES and NSC-34 cells were pre-treated with a 5% v/v HPL solution for 1h prior to exposure to toxins. In preliminary experiments, we had already determined that HPL solutions of up to 20% v/v did not affect LUHMES or NSC-34 cell viability (data not shown). The toxic effects of some of the drugs used, and the consequent loss of viability measured, were strongly inhibited by pre-treatment with HPLs (**Figure 1A-D**). These protective effects were correlated with significantly lower cytosolic levels of ROS. The results of our experiments on NSC-34 cells were consistent with evidences suggesting that oxidative stress and apoptosis are responsible for ALS pathogenesis (Zhu et al., 2015). Action of MPP<sup>+</sup> on LUHMES cells is not surprising since this cell line express the DAT (Scholz et al., 2011b). As we already observed, these increase in cytosolic ROS are not proportionally linked to the loss in viability. When the level of oxidative stress was less than five times that of the control, the cell death rate was around 50%. Above this five-fold threshold, the cell death rate rose to around 90%. The involvement of ferroptosis in LUHMES cell death is particularly

noteworthy and has not been studied previously. Ferroptosis seems involved in dopaminergic neuronal cell death and dysregulation of ferroptosis may be important in PD pathology. Given that the ROS signaling is a key factor in PD and that iron chelators have a potential for neuroprotective properties, the correlation with ferroptosis and dopaminergic neuronal cell death in PD could be reasonable. Taken as a whole, our results show clearly that HPLs provided a broad and effective neuroprotection. Platelets contain several GFs (such as PDGF, BDNF, bFGF and VEGF) with demonstrated neuroprotective properties *in vitro* or *in vivo* (Burnouf et al., 2016). In our HPL preparations all these GFs were present, although there were, as expected, some variations in concentration from one HPL preparation to another (**Figure 1E**). We compared the neuroprotective properties of our HPL preparations with those of these recombinant GFs (rGFs) when LUHMES cells were intoxicated with erastin or MPP<sup>+</sup> and when NSC-34 cells were intoxicated with STS or menadione (**Figure 1F and G**). The rGF concentration used in our experiments was defined according to the literature data (when available) or the factor's concentration in our HPLs. When possible, both concentrations were tested. A mixture of factors at their highest concentrations was also assessed (**Figure 1H**). As with the HPLs, cells were incubated with rGFs (alone or mixed) for 1h prior to exposure to neurotoxins. None of the rGFs were able to protect LUHMES or NSC-34 cells as efficiently as a 5% v/v HPL solution. PDGF, BDNF, bFGF and VEGF act on cell survival through tyrosine kinase receptors, which regulate specific signaling pathways downstream. These receptors are well characterized, and some are present as different isoforms. We quantified the receptors' mRNA expression levels using real-time quantitative PCR assays (**Figure 1I**). Although not all isoforms were present in differentiated LUHMES and NSC-34 cells, mRNAs for at least one isoform of each rGF receptor

were detected. These results suggest that the rGFs' lack of effect is not related to the absence of their receptors.

In order to determine the extent of which GFs contribute to the protection afforded by HPLs and then identify the pathways involved, cells were treated with specific inhibitors of the main signaling pathways 1h before the addition of HPLs and 2h before exposure to the various drugs. Akt, MEK, Ras and phospholipase C (PLC) were respectively inhibited by treatment with MK-2206, U0126, manumycin A and U73122 (**Figure 2A**). For each inhibitor, we first determined the efficient but harmless dose for LUHMES and NSC-34 cells (data not shown). Cell viability and levels of oxidative stress were monitored by flow cytometry with propidium iodide and hydroethidium, respectively. Again, we observed a clear association between oxidative stress and cell death. A 4- to 5-fold relative increase in oxidative stress was associated with a cell death rate of 40-50%. Above this threshold, the cell death rate rose to 80 to 90%. For the PLC pathway in NSC-34 cells, the protection afforded by HPLs was not affected by treatment with the specific inhibitor U73122 (**Figure 2E**). In contrast, remarkable results were obtained with LUHMES cells. Firstly, inhibition of PLC alone was enough to counteract the toxicity the oxidative stress induced by MPP+ (**Figure 2C and D**). Secondly, U73122 (iPLC) blocked the protection afforded by HPLs against erastin-induced cell death (**Figure 2B**). The toxicity of MPP+ has not previously been linked to the PLC or ferroptosis pathways. Likewise, an interaction between PLC inhibition and ferroptosis was not even observed when Kang and collaborators screened a library containing 244 kinase inhibitors in an effort to identify kinases involved in ferroptotic cell death (Kang et al., 2014). This is an open field for further research. When considering the Ras and MEK pathways in LUHMES cells, we found that U0126 (iMEK) and manumycin A (iRas) had no effect



on erastin-induced cell death (**Figure 2B**). This was unexpected, since it has been reported that erastin-induced ferroptosis requires Ras-dependent MEK/ERK activation (Dixon et al., 2012b). However, given that most of the research to date on ferroptosis has been performed with the BJTERT/LT/ST/RASV<sup>12</sup> engineered human tumor cell lines, we conclude that these differences are due to the specific characteristics of dopaminergic cells. Moreover in LUHMES cells HPLs protection against ferroptosis was unaffected by these two inhibitors. U0126 (iMEK) (but not manumycin A (iRas)) was able to counteract the HPLs' protective effect against MPP+ (**Figure 2C and D**). Ras-independent MEK/ERK activation has already been reported (Schmidt et al., 2000b) and may be involved in the protection afforded by HPLs against MPP+–induced oxidative stress. Ras-independent MEK/ERK activation may also help to protect NSC-34 cells against apoptosis, since the iMEK (but not the iRas) was able to modify the HPLs' protective effects against STS's toxicity (**Figure 2E**). Neither the iMEK nor the iRas counteracted the protection afforded by HPLs against menadione-induced cell death and oxidative stress (**Figure 2F and G**). Thus, MEK activation does not appear to be involved in Ras-independent protection against oxidative stress in NSC-34 cells. The Akt inhibitor MK-2206 was the most effective compound, since it abolished the protection afforded by HPLs in both cell lines (**Figure 2B, C, E and F**). In LUHMES and NSC-34 cells, the iAkt restored a high level of oxidative stress when cell were treated with HPLs+MPP+ or HPLs+menadione (**Figure 2D and G**). Involvement of the Akt pathway in the protection afforded by the HPLs is consistent with previously reported data. The serine/threonine protein kinase Akt is involved in the regulation of many different cellular processes, such as cell growth, survival, proliferation, apoptosis, metabolism and angiogenesis. Deregulation of Akt signaling is associated with several human diseases, and a growing body of evidence suggests that Akt is neuroprotective; Akt

malfunction has been reported in PD brains (Jha et al., 2015) and in the spinal cord of ALS patients (through its inhibition of glycogen synthase kinase-3) (Koh et al., 2005). Yin et al. have even suggested that inhibition of the Akt pathway is associated with the death of ALS motor neurons (Yin et al., 2015).

In conclusion, our present results suggested that the neuroprotective effects of HPLs may be due at least partly to the GFs that they contain. The HPLs prevent cell death by activating specific pathways (the Akt pathway and, to a lesser extent, the MEK pathway). Single rGFs are known to activate the Akt or MEK pathways and protect neurons *in vitro* (Chung et al., 2015). Moreover, it is well known that PDGF and BDNF stimulate survival signals through the Akt pathway and thus rescue cells from apoptosis. In our experiments, recombinant PDGF and BDNF were unable - in contrast to HPLs - to protect NSC-34 or LUHMES cells. Activation of a canonical signaling pathway by a single extracellular stimulus regulates a small number of Akt substrates and cellular processes; the latter context is rarely encountered by a neuron *in vivo*. Even though the HPLs' exact mechanisms of action are not yet known, it is nevertheless reasonable to assume that their valuable functional effects are caused by a mixture of pleiotropic GFs. *In vivo*, HPLs might increase the survival of new brain cells and may constitute an attractive therapeutic strategy in neurodegenerative diseases. To this end, Intracerebroventricular or intranasal administration of HPLs will be performed in animal model of PD and ALS in our future studies.

## References

- Baron M, Kudin AP, Kunz WS. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochem. Soc. Trans.* 2007; 35: 1228–1231.
- Bertrand R, Solary E, O'Connor P, Kohn KW, Pommier Y. Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp. Cell Res.* 1994; 211: 314–321.
- Burnouf T, Strunk D, Koh MBC, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* 2016; 76: 371–387.
- Chung J-Y, Kim H-J, Kim M. The protective effect of growth hormone on Cu/Zn superoxide dismutase-mutant motor neurons. *BMC Neurosci.* 2015; 16: 1.
- Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012; 149: 1060–1072.
- Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 1991; 253: 905–909.
- Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1985; 82: 2173–2177.
- Jha SK, Jha NK, Kar R, Ambasta RK, Kumar P. p38 MAPK and PI3K/AKT Signalling Cascades in Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Cell. Med.* 2015; 4: 67–86.
- Kang Y, Tiziani S, Park G, Kaul M, Paternostro G. Cellular protection using Flt3 and PI3K $\alpha$  inhibitors demonstrates multiple mechanisms of oxidative glutamate toxicity. *Nat. Commun.* 2014; 5: 3672.

- Koh S-H, Lee Y-B, Kim KS, Kim H-J, Kim M, Lee YJ, et al. Role of GSK-3 $\beta$  activity in motor neuronal cell death induced by G93A or A4V mutant hSOD1 gene. *Eur. J. Neurosci.* 2005; 22: 301–309.
- Maier O, Böhm J, Dahm M, Brück S, Beyer C, Johann S. Differentiated NSC-34 motoneuron-like cells as experimental model for cholinergic neurodegeneration. *Neurochem. Int.* 2013; 62: 1029–1038.
- Monteiro JP, Martins AF, Nunes C, Morais CM, Lúcio M, Reis S, et al. A biophysical approach to menadione membrane interactions: relevance for menadione-induced mitochondria dysfunction and related deleterious/therapeutic effects. *Biochim. Biophys. Acta* 2013; 1828: 1899–1908.
- Schmidt M, Goebeler M, Posern G, Feller SM, Seitz CS, Bröcker E-B, et al. Ras-independent Activation of the Raf/MEK/ERK Pathway upon Calcium-induced Differentiation of Keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 41011–41017.
- Scholz D, Pörtl D, Genewsky A, Weng M, Waldmann T, Schildknecht S, et al. Rapid, complete and large-scale generation of post-mitotic neurons from the human LUHMES cell line. *J. Neurochem.* 2011; 119: 957–971.
- Yin X, Ren M, Jiang H, Cui S, Wang S, Jiang H, et al. Downregulated AEG-1 together with inhibited PI3K/Akt pathway is associated with reduced viability of motor neurons in an ALS model. *Mol. Cell. Neurosci.* 2015; 68: 303–313.
- Zhu Y, Fotinos A, Mao LLJ, Atassi N, Zhou EW, Ahmad S, et al. Neuroprotective agents target molecular mechanisms of disease in ALS. *Drug Discov. Today* 2015; 20: 65–75.

**Contributors.** FG, BDV and MLC were involved in the conception and the experimental design of the research project, and performed experiments. AJ performed experiments. CM and RB were involved in critical comment of the report. TB, JCD, DD were involved in the conception, experimental design, critical comment and wrote the manuscript.

## Figures legends

### Figure 1

Effect of PLs on cell viability (A and B). Effects of PLs on oxidative stress (C and D). LUHMES and NSC-34 cells were cultured in the absence (black columns) or presence (white columns) of a 5% PL preparation prior to the addition of STS, rapamycin (rapa), erastin or menadione (mena) for 24h or MPP+ for 48h. \*\*\*  $p < 0.0001$ , ##  $p < 0.001$  versus control and ###  $p < 0.001$  versus control with the Mann-Whitney non parametric test. The concentration of GFs in PLs (E). Values represent mean  $\pm$  standard error of the mean for six different PLs (ng/ml). Effects of single rGFs (Luhmes (F) and NSC-34 (G)) or mixtures of rGFs (H) on cell viability. Cells were treated (black columns) for 1 h prior to the addition of a cell death inducer (erastin for LUHMES cells or STS for NSC-34 cells; grey columns) or an oxidative stress inducer (MPP+ for LUHMES cells or menadione for NSC-34 cells; white columns). Mixtures contained the highest observed concentration of each rGF. No statistical differences were observed between Luhmes or NSC-34 cells treated with cell death inducer or oxidative stress inducer alone and pre-treated with GFs at different concentration (Kruskal-Wallis non parametric test). Real-time quantitative PCR assays of mRNAs coding for the various isoforms of the FGF, PDGF, VEGF and neurotrophin receptors (I). All data were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean from at least three experiments. Cell viability and oxidative stress were measured using flow cytometry with propidium iodide and hydroethidium respectively.

**Figure 2**

Inhibition of specific signaling pathways. A) The respective sites of action of the different inhibitors used in our experiments. Cells were treated with MK-2206 (an Akt inhibitor), U0126 (a MEK inhibitor), manumycin A (a Ras inhibitor) or U73122 (a PLC inhibitor). B-G) Effects of inhibitors on LUHMES and NSC- 34 cells treated with PLs and specific drugs. LUHMES cells were treated with erastin (B) or MMP+ (C and D), and NSC-34 cells were treated with STS (E) or menadione (m) (F and G). Cell viability (B, C, E, and F) and oxidative stress (D and G) were measured using flow cytometry with propidium iodide and hydroethidium respectively. H) Graphical abstract of the main results. Data were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean from at least three experiments. For statistical analysis, data were analyzed by performing the Mann-Whitney non parametric test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ ).

Figure 1

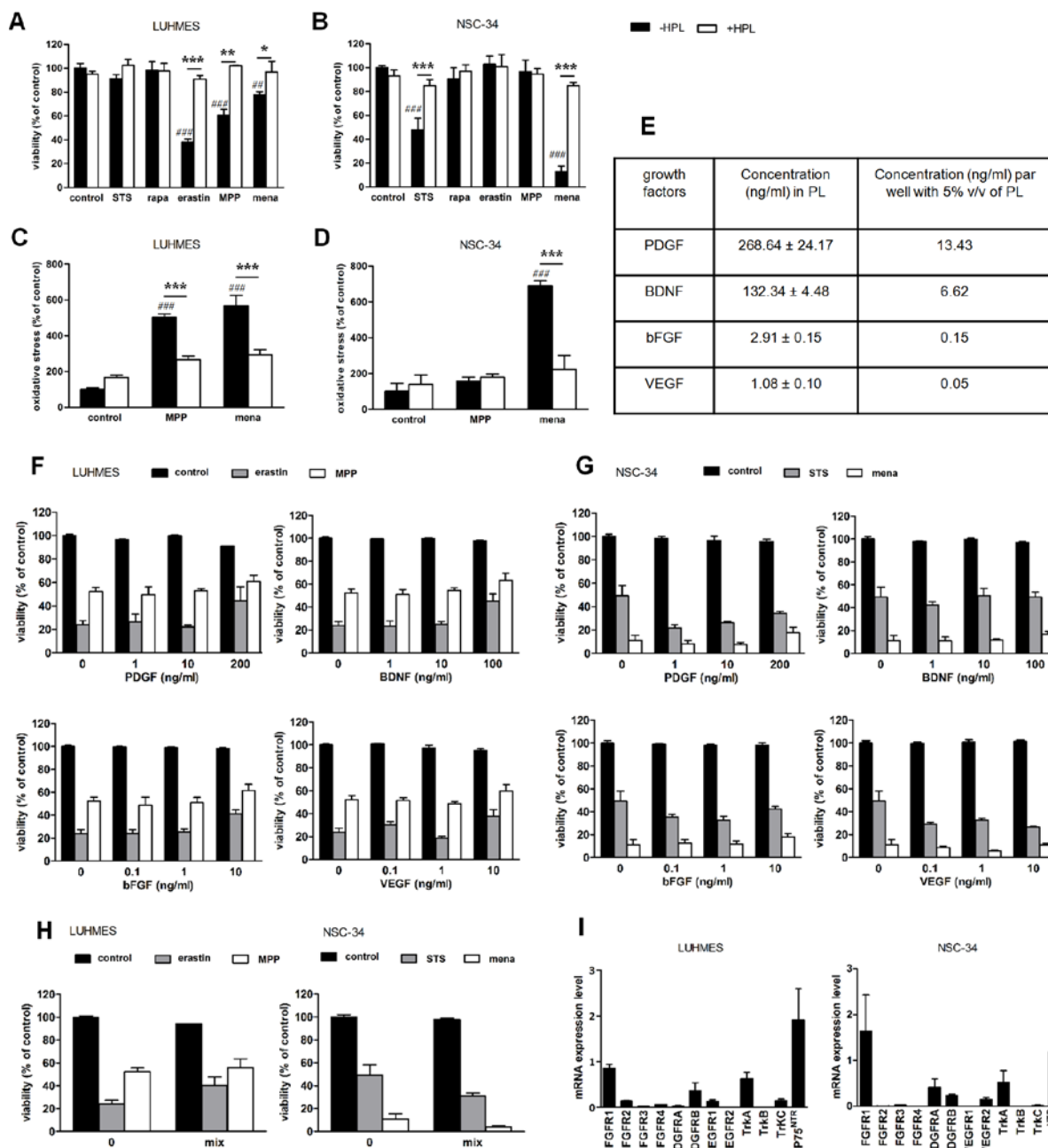
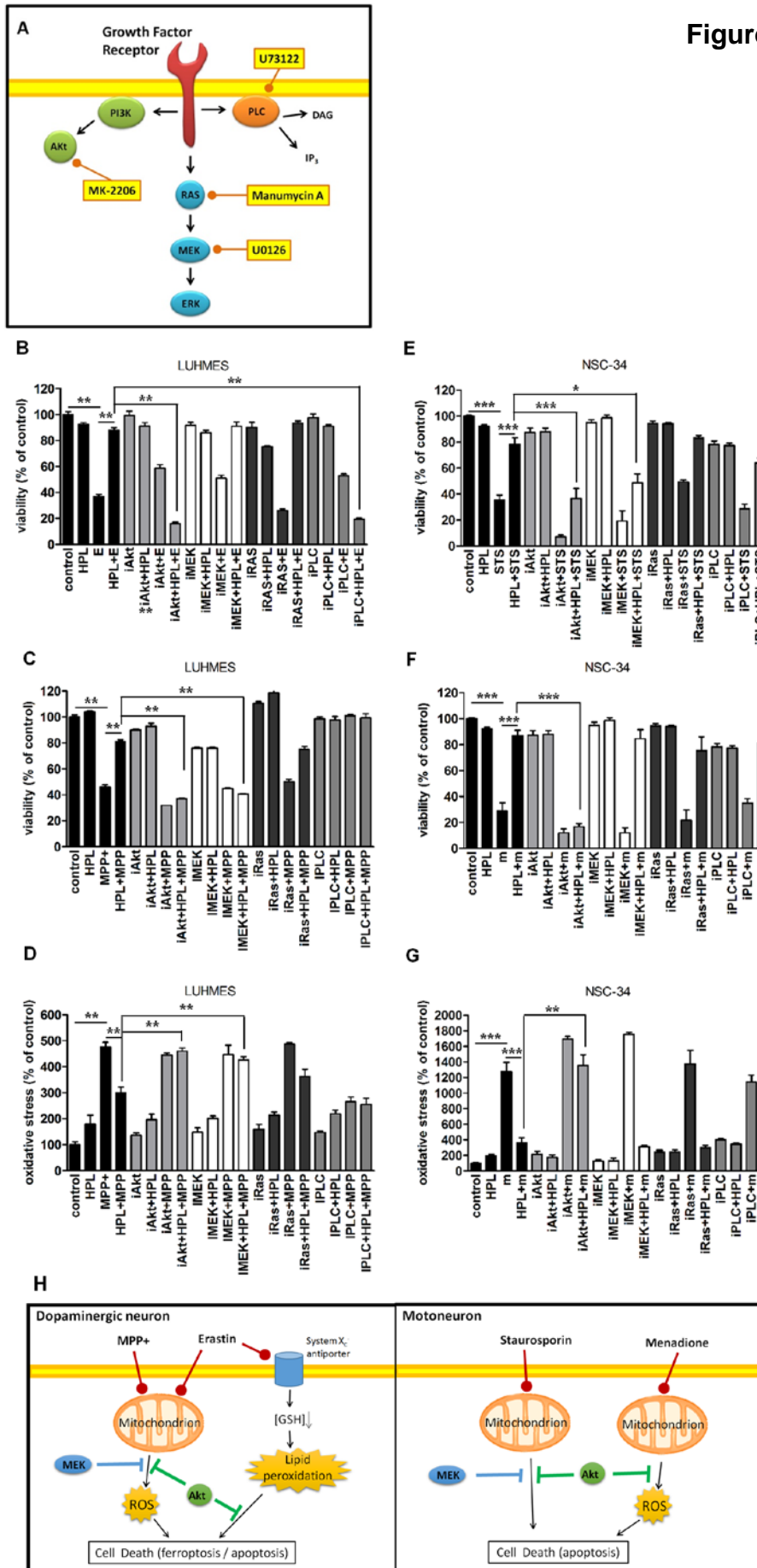




Figure 2



# **REFERENCES**

- Alberio, T., Lopiano, L., Fasano, M., 2012. Cellular models to investigate biochemical pathways in Parkinson's disease. *FEBS J.* 279, 1146–1155. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08516.x
- Andersen, J.K., Mo, J.Q., Hom, D.G., Lee, F.Y., Harnish, P., Hamill, R.W., McNeill, T.H., 1996. Effect of buthionine sulfoximine, a synthesis inhibitor of the antioxidant glutathione, on the murine nigrostriatal neurons. *J. Neurochem.* 67, 2164–2171.
- Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M.T., Michel, P.P., Marquez, J., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Hirsch, E.C., Agid, Y., 1997. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol. Histopathol.* 12, 25–31.
- Aquino, D., Bizzi, A., Grisoli, M., Garavaglia, B., Bruzzone, M.G., Nardocci, N., Savoiaro, M., Chiapparini, L., 2009. Age-related iron deposition in the basal ganglia: quantitative analysis in healthy subjects. *Radiology* 252, 165–172. doi:10.1148/radiol.2522081399
- Arthur, J.R., 2000. The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 57, 1825–1835.
- Aubin, N., Curet, O., Deffois, A., Carter, C., 1998. Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice. *J. Neurochem.* 71, 1635–1642.
- Avery, S.V., 2011. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem. J.* 434, 201–210. doi:10.1042/BJ20101695
- Ayton, S., Lei, P., Duce, J.A., Wong, B.X.W., Sedjahtera, A., Adlard, P.A., Bush, A.I., Finkelstein, D.I., 2013. Ceruloplasmin dysfunction and therapeutic potential for Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 73, 554–559. doi:10.1002/ana.23817
- Ayton, S., Lei, P., Hare, D.J., Duce, J.A., George, J.L., Adlard, P.A., McLean, C., Rogers, J.T., Cherny, R.A., Finkelstein, D.I., Bush, A.I., 2015. Parkinson's disease iron deposition caused by nitric oxide-induced loss of  $\beta$ -amyloid precursor protein. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 3591–3597. doi:10.1523/JNEUROSCI.3439-14.2015
- Banerjee, R., Starkov, A.A., Beal, M.F., Thomas, B., 2009. Mitochondrial dysfunction in the limelight of Parkinson's disease pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 651–663. doi:10.1016/j.bbadis.2008.11.007
- Bar-Am, O., Amit, T., Kupersmidt, L., Aluf, Y., Mechlovich, D., Kabha, H., Danovitch, L., Zurawski, V.R., Youdim, M.B.H., Weinreb, O., 2015. Neuroprotective and neurorestorative activities of a novel iron chelator-brain selective monoamine oxidase-A/monoamine oxidase-B inhibitor in animal models of Parkinson's disease and aging. *Neurobiol. Aging* 36, 1529–1542. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.10.026

- Barger, S.W., Goodwin, M.E., Porter, M.M., Beggs, M.L., 2007. Glutamate release from activated microglia requires the oxidative burst and lipid peroxidation. *J. Neurochem.* 101, 1205–1213. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04487.x
- Barrera, G., Gentile, F., Pizzimenti, S., Canuto, R.A., Daga, M., Arcaro, A., Cetrangolo, G.P., Lepore, A., Ferretti, C., Dianzani, C., Muzio, G., 2016. Mitochondrial Dysfunction in Cancer and Neurodegenerative Diseases: Spotlight on Fatty Acid Oxidation and Lipoperoxidation Products. *Antioxid. Basel Switz.* 5. doi:10.3390/antiox5010007
- Belaidi, A.A., Bush, A.I., 2015. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. *J. Neurochem.* doi:10.1111/jnc.13425
- Bellinger, F.P., Bellinger, M.T., Seale, L.A., Takemoto, A.S., Raman, A.V., Miki, T., Manning-Boğ, A.B., Berry, M.J., White, L.R., Ross, G.W., 2011. Glutathione Peroxidase 4 is associated with Neuromelanin in Substantia Nigra and Dystrophic Axons in Putamen of Parkinson's brain. *Mol. Neurodegener.* 6, 8. doi:10.1186/1750-1326-6-8
- Ben-Shachar, D., Eshel, G., Finberg, J.P., Youdim, M.B., 1991. The iron chelator desferrioxamine (Desferal) retards 6-hydroxydopamine-induced degeneration of nigrostriatal dopamine neurons. *J. Neurochem.* 56, 1441–1444.
- Berghe, T.V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., Vandenabeele, P., 2014. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 135–147.
- Bezard, E., Dovero, S., Bioulac, B., Gross, C.E., 1997. Kinetics of nigral degeneration in a chronic model of MPTP-treated mice. *Neurosci. Lett.* 234, 47–50. doi:10.1016/S0304-3940(97)00663-0
- Bisaglia, M., Tessari, I., Mammi, S., Bubacco, L., 2009. Interaction between alpha-synuclein and metal ions, still looking for a role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neuromolecular Med.* 11, 239–251. doi:10.1007/s12017-009-8082-1
- Biskup, S., Gerlach, M., Kupsch, A., Reichmann, H., Riederer, P., Vieregge, P., Wüllner, U., Gasser, T., 2008. Genes associated with Parkinson syndrome. *J. Neurol.* 255, 8–17. doi:10.1007/s00415-008-5005-2
- Blackinton, J., Kumaran, R., van der Brug, M.P., Ahmad, R., Olson, L., Galter, D., Lees, A., Bandopadhyay, R., Cookson, M.R., 2009a. Post-transcriptional regulation of mRNA associated with DJ-1 in sporadic Parkinson disease. *Neurosci. Lett.* 452, 8–11. doi:10.1016/j.neulet.2008.12.053
- Boland, B., Nixon, R.A., 2006. Neuronal macroautophagy: From development to degeneration. *Mol. Aspects Med., Autophagy* 27, 503–519. doi:10.1016/j.mam.2006.08.009

- Bourdenx, M., Dovero, S., Engeln, M., Bido, S., Bastide, M.F., Dutheil, N., Vollenweider, I., Baud, L., Piron, C., Grouthier, V., Boraud, T., Porras, G., Li, Q., Baekelandt, V., Scheller, D., Michel, A., Fernagut, P.-O., Georges, F., Courtine, G., Bezard, E., Dehay, B., 2015. Lack of additive role of ageing in nigrostriatal neurodegeneration triggered by  $\alpha$ -synuclein overexpression. *Acta Neuropathol. Commun.* 3. doi:10.1186/s40478-015-0222-2
- Brandel, J.-P., Corbillé, A.-G., Derkinderen, P., Haïk, S., 2015. [Is Parkinson's disease a prion disease?]. *Rev. Neurol. (Paris)* 171, 812–824. doi:10.1016/j.neurol.2015.10.005
- Brenner, D., Mak, T.W., 2009. Mitochondrial cell death effectors. *Curr. Opin. Cell Biol., Cell differentiation / Cell division, growth and death* 21, 871–877. doi:10.1016/j.ceb.2009.09.004
- Brigelius-Flohé, R., Maiorino, M., 2013. Glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1830, 3289–3303. doi:10.1016/j.bbagen.2012.11.020
- Bulua, A.C., Simon, A., Maddipati, R., Pelletier, M., Park, H., Kim, K.-Y., Sack, M.N., Kastner, D.L., Siegel, R.M., 2011. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *J. Exp. Med.* 208, 519–533. doi:10.1084/jem.20102049
- Bundel, D.D., Schallier, A., Loyens, E., Fernando, R., Miyashita, H., Liefferinge, J.V., Vermoesen, K., Bannai, S., Sato, H., Michotte, Y., Smolders, I., Massie, A., 2011. Loss of System xc<sup>-</sup> Does Not Induce Oxidative Stress But Decreases Extracellular Glutamate in Hippocampus and Influences Spatial Working Memory and Limbic Seizure Susceptibility. *J. Neurosci.* 31, 5792–5803. doi:10.1523/JNEUROSCI.5465-10.2011
- Butterfield, D.A., Dalle-Donne, I., 2014. Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and disease. *Mass Spectrom. Rev.* 33, 1–6. doi:10.1002/mas.21404
- Cabantchik, Z.I., 2014. Labile iron in cells and body fluids: physiology, pathology, and pharmacology. *Front. Pharmacol.* 5. doi:10.3389/fphar.2014.00045
- Castellani, R.J., Siedlak, S.L., Perry, G., Smith, M.A., 2000. Sequestration of iron by Lewy bodies in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 100, 111–114.
- Cavaliere, F., Vicente, E.S., Matute, C., 2010. An organotypic culture model to study nigro-striatal degeneration. *J. Neurosci. Methods* 188, 205–212. doi:10.1016/j.jneumeth.2010.02.008
- Chen, J., Rusnak, M., Lombroso, P.J., Sidhu, A., 2009. Dopamine promotes striatal neuronal apoptotic death via ERK signaling cascades. *Eur. J. Neurosci.* 29, 287–306. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06590.x

- Chen, L., Li, X., Liu, L., Yu, B., Xue, Y., Liu, Y., 2015. Erastin sensitizes glioblastoma cells to temozolomide by restraining xCT and cystathionine- $\gamma$ -lyase function. *Oncol. Rep.* doi:10.3892/or.2015.3712
- Chintala, S., Li, W., Lamoreux, M.L., Ito, S., Wakamatsu, K., Sviderskaya, E.V., Bennett, D.C., Park, Y.-M., Gahl, W.A., Huizing, M., Spritz, R.A., Ben, S., Novak, E.K., Tan, J., Swank, R.T., 2005. Slc7a11 gene controls production of pheomelanin pigment and proliferation of cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10964–10969. doi:10.1073/pnas.0502856102
- Chinta, S.J., Kumar, M.J., Hsu, M., Rajagopalan, S., Kaur, D., Rane, A., Nicholls, D.G., Choi, J., Andersen, J.K., 2007. Inducible alterations of glutathione levels in adult dopaminergic midbrain neurons result in nigrostriatal degeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 13997–14006. doi:10.1523/JNEUROSCI.3885-07.2007
- Cho, Y.S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T.D., Guildford, M., Chan, F.K.-M., 2009. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 137, 1112–1123. doi:10.1016/j.cell.2009.05.037
- Chu, Y., Dodiya, H., Aebischer, P., Olanow, C.W., Kordower, J.H., 2009. Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiol. Dis.* 35, 385–398. doi:10.1016/j.nbd.2009.05.023
- Conrad, M., Angeli, J.P.F., Vandenabeele, P., Stockwell, B.R., 2016. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* doi:10.1038/nrd.2015.6
- Constantinescu, R., Constantinescu, A.T., Reichmann, H., Janetzky, B., 2007. Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. *J. Neural Transm. Suppl.* 17–28.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A., 2006. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clin. Chem.* 52, 601–623. doi:10.1373/clinchem.2005.061408
- Dauer, W., Przedborski, S., 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889–909.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., Yuan, J., 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem. Biol.* 1, 112–119. doi:10.1038/nchembio711
- Devos, D., Moreau, C., Devedjian, J.C., Kluza, J., Petrault, M., Laloux, C., Jonneaux, A., Ryckewaert, G., Garçon, G., Rouaix, N., Duhamel, A., Jissendi, P., Dujardin, K., Auger, F., Ravasi, L., Hopes, L., Grolez, G., Firdaus, W., Sablonnière, B., Strubi-Vuillaume, I., Zahr, N., Destée, A., Corvol, J.-C., Pörtl, D., Leist, M., Rose, C., Defebvre, L., Marchetti, P., Cabantchik, Z.I., Bordet,

- R., 2014a. Targeting Chelatable Iron as a Therapeutic Modality in Parkinson's Disease. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 195–210. doi:10.1089/ars.2013.5593
- Dexter, D.T., Carayon, A., Vidailhet, M., Ruberg, M., Agid, F., Agid, Y., Lees, A.J., Wells, F.R., Jenner, P., Marsden, C.D., 1990. Decreased ferritin levels in brain in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 55, 16–20.
- Dexter, D.T., Statton, S.A., Whitmore, C., Freinbichler, W., Weinberger, P., Tipton, K.F., Della Corte, L., Ward, R.J., Crichton, R.R., 2011. Clinically available iron chelators induce neuroprotection in the 6-OHDA model of Parkinson's disease after peripheral administration. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* 118, 223–231. doi:10.1007/s00702-010-0531-3
- Dickson, D.W., Braak, H., Duda, J.E., Duyckaerts, C., Gasser, T., Halliday, G.M., Hardy, J., Leverenz, J.B., Del Tredici, K., Wszolek, Z.K., Litvan, I., 2009. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol.* 8, 1150–1157. doi:10.1016/S1474-4422(09)70238-8
- Dipasquale, B., Marini, A.M., Youle, R.J., 1991. Apoptosis and DNA degradation induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium in neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 1442–1448.
- Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., Morrison, B., Stockwell, B.R., 2012a. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Non-Apoptotic Cell Death. *Cell* 149, 1060–1072. doi:10.1016/j.cell.2012.03.042
- Dolma, S., Lessnick, S.L., Hahn, W.C., Stockwell, B.R., 2003a. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell* 3, 285–296.
- Donato, R., Miljan, E.A., Hines, S.J., Aouabdi, S., Pollock, K., Patel, S., Edwards, F.A., Sinden, J.D., 2007. Differential development of neuronal physiological responsiveness in two human neural stem cell lines. *BMC Neurosci.* 8, 36. doi:10.1186/1471-2202-8-36
- Double, K.L., 2012. Neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18 Suppl 1, S52–54. doi:10.1016/S1353-8020(11)70018-9
- Driver, J.A., 2012. Understanding the link between cancer and neurodegeneration. *J. Geriatr. Oncol.* 3, 58–67. doi:10.1016/j.jgo.2011.11.007
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95. doi:10.1152/physrev.00018.2001
- Edinger, A.L., Thompson, C.B., 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 663–669. doi:10.1016/j.ceb.2004.09.011
- Engeln, M., Fasano, S., Ahmed, S.H., Cador, M., Baekelandt, V., Bezard, E., Fernagut, P.-O., 2013. Levodopa gains psychostimulant-like properties after nigral dopaminergic loss. *Ann. Neurol.* 74, 140–144. doi:10.1002/ana.23881

- Esposito, S., Massaro, G., Vona, V., Di Martino Rigano, V., Carfagna, S., 2003. Glutamate synthesis in barley roots: the role of the plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Planta* 216, 639–647. doi:10.1007/s00425-002-0892-4
- Faucheux, B.A., Martin, M.-E., Beaumont, C., Hunot, S., Hauw, J.-J., Agid, Y., Hirsch, E.C., 2002. Lack of up-regulation of ferritin is associated with sustained iron regulatory protein-1 binding activity in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 83, 320–330. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.01118.x
- Favier, A., 2006. Stress oxydant et pathologies humaines, in: *Annales Pharmaceutiques Françaises*. Elsevier, pp. 390–396.
- Fenton, H.J.H., 1894. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans.* 65, 899–910. doi:10.1039/CT8946500899
- Forno, L.S., DeLanney, L.E., Irwin, I., Langston, J.W., 1996. Electron microscopy of Lewy bodies in the amygdala-parahippocampal region. Comparison with inclusion bodies in the MPTP-treated squirrel monkey. *Adv. Neurol.* 69, 217–228.
- Friedmann Angeli, J.P., Schneider, M., Proneth, B., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Hammond, V.J., Herbach, N., Aichler, M., Walch, A., Eggenhofer, E., Basavarajappa, D., Rådmark, O., Kobayashi, S., Seibt, T., Beck, H., Neff, F., Esposito, I., Wanke, R., Förster, H., Yefremova, O., Heinrichmeyer, M., Bornkamm, G.W., Geissler, E.K., Thomas, S.B., Stockwell, B.R., O'Donnell, V.B., Kagan, V.E., Schick, J.A., Conrad, M., 2014a. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat. Cell Biol.* 16, 1180–1191. doi:10.1038/ncb3064
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nuñez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H.-U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., Kroemer, G., 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 19, 107–120. doi:10.1038/cdd.2011.96
- Ganz, T., Nemeth, E., 2012. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res., Cell Biology of Metals* 1823, 1434–1443. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.01.014
- Garrido, M., Tereshchenko, Y., Zhevtsova, Z., Taschenberger, G., Bähr, M., Kügler, S., 2011. Glutathione depletion and overproduction both initiate degeneration of nigral dopaminergic neurons. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 121, 475–485. doi:10.1007/s00401-010-0791-x



- Giasson, B.I., Duda, J.E., Quinn, S.M., Zhang, B., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 2002. Neuronal  $\alpha$ -Synucleinopathy with Severe Movement Disorder in Mice Expressing A53T Human  $\alpha$ -Synuclein. *Neuron* 34, 521–533. doi:10.1016/S0896-6273(02)00682-7
- Gibb, W.R., Lees, A.J., 1989. The significance of the Lewy body in the diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 15, 27–44.
- Giráldez-Pérez, R.M., Antolín-Vallespín, M., Muñoz, M.D., Sánchez-Capelo, A., 2014. Models of  $\alpha$ -synuclein aggregation in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 2. doi:10.1186/s40478-014-0176-9
- Goetz, C.G., 2010. New developments in depression, anxiety, compulsiveness, and hallucinations in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 25 Suppl 1, S104–109. doi:10.1002/mds.22636
- Grolez, G., Moreau, C., Sablonnière, B., Garçon, G., Devedjian, J.-C., Meguig, S., Gelé, P., Delmaire, C., Bordet, R., Defebvre, L., Cabantchik, I.Z., Devos, D., 2015. Ceruloplasmin activity and iron chelation treatment of patients with Parkinson's disease. *BMC Neurol.* 15, 74. doi:10.1186/s12883-015-0331-3
- Grooten, J., Goossens, V., Vanhaesebroeck, B., Fiers, W., 1993. Cell membrane permeabilization and cellular collapse, followed by loss of dehydrogenase activity: Early events in tumour necrosis factor-induced cytotoxicity. *Cytokine* 5, 546–555. doi:10.1016/S1043-4666(05)80003-1
- Guzy, R.D., Hoyos, B., Robin, E., Chen, H., Liu, L., Mansfield, K.D., Simon, M.C., Hammerling, U., Schumacker, P.T., 2005. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab.* 1, 401–408. doi:10.1016/j.cmet.2005.05.001
- Halliday, G.M., Ophof, A., Broe, M., Jensen, P.H., Kettle, E., Fedorow, H., Cartwright, M.I., Griffiths, F.M., Shepherd, C.E., Double, K.L., 2005. Alpha-synuclein redistributes to neuromelanin lipid in the substantia nigra early in Parkinson's disease. *Brain J. Neurol.* 128, 2654–2664. doi:10.1093/brain/awh584
- Halliwel, B., 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* 97, 1634–1658. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x
- Halliwel, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.
- Hare, D., Ayton, S., Bush, A., Lei, P., 2013. A delicate balance: Iron metabolism and diseases of the brain. *Front. Aging Neurosci.* 5. doi:10.3389/fnagi.2013.00034
- Hare, D.J., Arora, M., Jenkins, N.L., Finkelstein, D.I., Doble, P.A., Bush, A.I., 2015. Is early-life iron exposure critical in neurodegeneration? *Nat. Rev. Neurol.* 11, 536–544. doi:10.1038/nrneurol.2015.100
- Hare, D.J., Lei, P., Ayton, S., Roberts, B.R., Grimm, R., George, J.L., Bishop, D.P., Beavis, A.D., Donovan, S.J., McColl, G., Volitakis, I., Masters, C.L., Adlard,

- P.A., Cherny, R.A., Bush, A.I., Finkelstein, D.I., Doble, P.A., 2014. An iron–dopamine index predicts risk of parkinsonian neurodegeneration in the substantia nigra pars compacta. *Chem Sci* 5, 2160–2169. doi:10.1039/C3SC53461H
- Hassler, R., 1938. Zur pathologie der Paralysis agitans und des postenzephalitischen parkinsonismus. *J. Psychol. Neurol.* 387–455.
- Hastings, T.G., 1995. Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase. *J. Neurochem.* 64, 919–924.
- Heikkila, R.E., Cohen, G., 1972. In vivo generation of hydrogen peroxide from 6-hydroxydopamine. *Experientia* 28, 1197–1198.
- Heikkila, R.E., Hess, A., Duvoisin, R.C., 1984. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 224, 1451–1453.
- Hemendinger, R.A., Armstrong, E.J., Persinski, R., Todd, J., Mougeot, J.-L., Volvovitz, F., Rosenfeld, J., 2008. Huperzine A provides neuroprotection against several cell death inducers using in vitro model systems of motor neuron cell death. *Neurotox. Res.* 13, 49–61.
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Andrews, N.C., 2004. Balancing Acts. *Cell* 117, 285–297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00343-5
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Galy, B., Camaschella, C., 2010. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 142, 24–38. doi:10.1016/j.cell.2010.06.028
- Hirsch, E.C., Brandel, J.P., Galle, P., Javoy-Agid, F., Agid, Y., 1991. Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an X-ray microanalysis. *J. Neurochem.* 56, 446–451.
- Hirsch, E.C., Graybiel, A.M., Duyckaerts, C., Javoy-Agid, F., 1987. Neuronal loss in the pedunculo-pontine tegmental nucleus in Parkinson disease and in progressive supranuclear palsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 5976–5980.
- Hirsch, E., Graybiel, A.M., Agid, Y.A., 1988. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334, 345–348. doi:10.1038/334345a0
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.-L., Schneider, P., Seed, B., Tschopp, J., 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* 1, 489–495. doi:10.1038/82732
- Hüls, S., Högen, T., Vassallo, N., Danzer, K.M., Hengerer, B., Giese, A., Herms, J., 2011. AMPA-receptor-mediated excitatory synaptic transmission is enhanced by iron-induced  $\alpha$ -synuclein oligomers. *J. Neurochem.* 117, 868–878. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07254.x

- Hunter, R.L., Dragicevic, N., Seifert, K., Choi, D.Y., Liu, M., Kim, H.-C., Cass, W.A., Sullivan, P.G., Bing, G., 2007. Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system. *J. Neurochem.* 100, 1375–1386. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04327.x
- Hu, W., He, Y., Xiong, Y., Lu, H., Chen, H., Hou, L., Qiu, Z., Fang, Y., Zhang, S., 2015. Derivation, Expansion, and Motor Neuron Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells with Non-Integrating Episomal Vectors and a Defined Xenogeneic-free Culture System. *Mol. Neurobiol.* 1–12. doi:10.1007/s12035-014-9084-z
- Inder, T., Mocatta, T., Darlow, B., Spencer, C., Volpe, J.J., Winterbourn, C., 2002. Elevated free radical products in the cerebrospinal fluid of VLBW infants with cerebral white matter injury. *Pediatr. Res.* 52, 213–218. doi:10.1203/00006450-200208000-00013
- Iravani, M.M., Sadeghian, M., Leung, C.C.M., Jenner, P., Rose, S., 2012. Lipopolysaccharide-induced nigral inflammation leads to increased IL-1 $\beta$  tissue content and expression of astrocytic glial cell line-derived neurotrophic factor. *Neurosci. Lett.* 510, 138–142. doi:10.1016/j.neulet.2012.01.022
- Jackson-Lewis, V., Jakowec, M., Burke, R.E., Przedborski, S., 1995. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegener. J. Neurodegener. Disord. Neuroprotection Neuroregeneration* 4, 257–269.
- Jankovic, J., 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 368–376. doi:10.1136/jnnp.2007.131045
- Jellinger, K.A., 1999. Post mortem studies in Parkinson's disease--is it possible to detect brain areas for specific symptoms? *J. Neural Transm. Suppl.* 56, 1–29.
- Jenner, P., 1993. Altered mitochondrial function, iron metabolism and glutathione levels in Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 146, 6–13.
- Johnson, F., Giulivi, C., 2005. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol. Aspects Med., Trace Elements and Human Health* 26, 340–352. doi:10.1016/j.mam.2005.07.006
- Kanai, Y., Endou, H., 2003. Functional properties of multispecific amino acid transporters and their implications to transporter-mediated toxicity. *J. Toxicol. Sci.* 28, 1–17.
- Kang, J., Pervaiz, S., Kang, J., Pervaiz, S., 2012. Mitochondria: Redox Metabolism and Dysfunction, Mitochondria: Redox Metabolism and Dysfunction. *Biochem. Res. Int. Biochem. Res. Int.* 2012, 2012, e896751. doi:10.1155/2012/896751, 10.1155/2012/896751
- Kang, Y., Tiziani, S., Park, G., Kaul, M., Paternostro, G., 2014. Cellular protection using Flt3 and PI3K $\alpha$  inhibitors demonstrates multiple mechanisms of oxidative glutamate toxicity. *Nat. Commun.* 5, 3672. doi:10.1038/ncomms4672

- Kannan, null, Jain, null, 2000. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiol. Off. J. Int. Soc. Pathophysiol. ISP* 7, 153–163.
- Karachi, C., Grabli, D., Bernard, F.A., Tandé, D., Wattiez, N., Belaid, H., Bardinet, E., Prigent, A., Nothacker, H.-P., Hunot, S., Hartmann, A., Lehéricy, S., Hirsch, E.C., François, C., 2010. Cholinergic mesencephalic neurons are involved in gait and postural disorders in Parkinson disease. *J. Clin. Invest.* 120, 2745–2754. doi:10.1172/JCI42642
- Karlsson, O., Lindquist, N.G., 2013. Melanin affinity and its possible role in neurodegeneration. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* 120, 1623–1630. doi:10.1007/s00702-013-1062-5
- Kastner, A., Hirsch, E.C., Lejeune, O., Javoy-Agid, F., Rascol, O., Agid, Y., 1992. Is the vulnerability of neurons in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease related to their neuromelanin content? *J. Neurochem.* 59, 1080–1089.
- Kaur, D., Yantiri, F., Rajagopalan, S., Kumar, J., Mo, J.Q., Boonplueang, R., Viswanath, V., Jacobs, R., Yang, L., Beal, M.F., DiMonte, D., Volitaskis, I., Ellerby, L., Cherny, R.A., Bush, A.I., Andersen, J.K., 2003. Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: a novel therapy for Parkinson's disease. *Neuron* 37, 899–909.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- Kim, G.H., Kim, J.E., Rhie, S.J., Yoon, S., 2015. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp. Neurobiol.* 24, 325–340. doi:10.5607/en.2015.24.4.325
- Krug, A.K., Balmer, N.V., Matt, F., Schönenberger, F., Merhof, D., Leist, M., 2013. Evaluation of a human neurite growth assay as specific screen for developmental neurotoxicants. *Arch. Toxicol.* 87, 2215–2231. doi:10.1007/s00204-013-1072-y
- Kumar, M.J., Andersen, J.K., 2004. Perspectives on MAO-B in aging and neurological disease: where do we go from here? *Mol. Neurobiol.* 30, 77–89. doi:10.1385/MN:30:1:077
- Kupersmidt, L., Weinreb, O., Amit, T., Mandel, S., Bar-Am, O., Youdim, M.B.H., 2011. Novel molecular targets of the neuroprotective/neurorescue multimodal iron chelating drug M30 in the mouse brain. *Neuroscience* 189, 345–358. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.03.040
- Kwiatkowski, A., Ryckewaert, G., Jissendi Tchofo, P., Moreau, C., Vuillaume, I., Chinnery, P.F., Destée, A., Defebvre, L., Devos, D., 2012. Long-term improvement under deferiprone in a case of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18, 110–112. doi:10.1016/j.parkreldis.2011.06.024

- Lannuzel, A., Michel, P.P., Höglinger, G.U., Champy, P., Jousset, A., Medja, F., Lombès, A., Darios, F., Gleye, C., Laurens, A., Hocquemiller, R., Hirsch, E.C., Ruberg, M., 2003. The mitochondrial complex I inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism. *Neuroscience* 121, 287–296. doi:10.1016/S0306-4522(03)00441-X
- Leaver, K.R., Allbutt, H.N., Creber, N.J., Kassiou, M., Henderson, J.M., 2009. Oral pre-treatment with epigallocatechin gallate in 6-OHDA lesioned rats produces subtle symptomatic relief but not neuroprotection. *Brain Res. Bull.* 80, 397–402. doi:10.1016/j.brainresbull.2009.08.013
- Lee, M., 2013. Neurotransmitters and microglial-mediated neuroinflammation. *Curr. Protein Pept. Sci.* 14, 21–32.
- Levine, B., Huang, Q., Isaacs, J.T., Reed, J.C., Griffin, D.E., Hardwick, J.M., 1993. Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the bcl-2 cellular oncogene. *Nature* 361, 739–742. doi:10.1038/361739a0
- Levine, B., Klionsky, D.J., 2004. Development by Self-Digestion. *Dev. Cell* 6, 463–477. doi:10.1016/S1534-5807(04)00099-1
- Levine, B., Kroemer, G., 2008. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* 132, 27–42. doi:10.1016/j.cell.2007.12.018
- Levites, Y., Weinreb, O., Maor, G., Youdim, M.B., Mandel, S., 2001. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *J. Neurochem.* 78, 1073–1082.
- Linert, W., Herlinger, E., Jameson, R.F., Kienzl, E., Jellinger, K., Youdim, M.B., 1996. Dopamine, 6-hydroxydopamine, iron, and dioxygen--their mutual interactions and possible implication in the development of Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1316, 160–168.
- Linert, W., Jameson, G.N.L., 2000. Redox reactions of neurotransmitters possibly involved in the progression of Parkinson's Disease. *J. Inorg. Biochem.* 79, 319–326. doi:10.1016/S0162-0134(99)00238-X
- Linkermann, A., Skouta, R., Himmerkus, N., Mulay, S.R., Dewitz, C., De Zen, F., Prokai, A., Zuchtriegel, G., Krombach, F., Welz, P.-S., Weinlich, R., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Pasparakis, M., Bleich, M., Weinberg, J.M., Reichel, C.A., Bräsen, J.H., Kunzendorf, U., Anders, H.-J., Stockwell, B.R., Green, D.R., Krautwald, S., 2014. Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 16836–16841. doi:10.1073/pnas.1415518111
- Lis, A., Paradkar, P.N., Singleton, S., Kuo, H.-C., Garrick, M.D., Roth, J.A., 2005. Hypoxia induces changes in expression of isoforms of the divalent metal transporter (DMT1) in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Biochem. Pharmacol.* 69, 1647–1655. doi:10.1016/j.bcp.2005.03.023

- Liu, Y., Wang, W., Li, Y., Xiao, Y., Cheng, J., Jia, J., 2015. The 5-Lipoxygenase Inhibitor Zileuton Confers Neuroprotection against Glutamate Oxidative Damage by Inhibiting Ferroptosis. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 1234–1239. doi:10.1248/bpb.b15-00048
- Lok, C.N., Ponka, P., 1999. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J. Biol. Chem.* 274, 24147–24152.
- Lo, M., Ling, V., Wang, Y.Z., Gout, P.W., 2008. The xc- cystine/glutamate antiporter: a mediator of pancreatic cancer growth with a role in drug resistance. *Br. J. Cancer* 99, 464–472. doi:10.1038/sj.bjc.6604485
- Lotharius, J., 2005. Progressive Degeneration of Human Mesencephalic Neuron-Derived Cells Triggered by Dopamine-Dependent Oxidative Stress Is Dependent on the Mixed-Lineage Kinase Pathway. *J. Neurosci.* 25, 6329–6342. doi:10.1523/JNEUROSCI.1746-05.2005
- Lotharius, J., 2002. Effect of Mutant alpha -Synuclein on Dopamine Homeostasis in a New Human Mesencephalic Cell Line. *J. Biol. Chem.* 277, 38884–38894. doi:10.1074/jbc.M205518200
- Lu, H., Meng, X., Yang, C.S., 2003. Enzymology of methylation of tea catechins and inhibition of catechol-O-methyltransferase by (-)-epigallocatechin gallate. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 31, 572–579.
- Lu, X.-H., Fleming, S.M., Meurers, B., Ackerson, L.C., Mortazavi, F., Lo, V., Hernandez, D., Sulzer, D., Jackson, G.R., Maidment, N.T., Chesselet, M.-F., Yang, X.W., 2009. Bacterial artificial chromosome transgenic mice expressing a truncated mutant parkin exhibit age-dependent hypokinetic motor deficits, dopaminergic neuron degeneration, and accumulation of proteinase K-resistant alpha-synuclein. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 1962–1976. doi:10.1523/JNEUROSCI.5351-08.2009
- Maier, O., Böhm, J., Dahm, M., Brück, S., Beyer, C., Johann, S., 2013. Differentiated NSC-34 motoneuron-like cells as experimental model for cholinergic neurodegeneration. *Neurochem. Int.* 62, 1029–1038. doi:10.1016/j.neuint.2013.03.008
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., Kroemer, G., 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 741–752. doi:10.1038/nrm2239
- Mallajosyula, J.K., Kaur, D., Chinta, S.J., Rajagopalan, S., Rane, A., Nicholls, D.G., Di Monte, D.A., Macarthur, H., Andersen, J.K., 2008. MAO-B Elevation in Mouse Brain Astrocytes Results in Parkinson's Pathology. *PLoS ONE* 3. doi:10.1371/journal.pone.0001616
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H., Kroemer, G., 2014. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 81–94. doi:10.1038/nrm3735

- Martel, C., Wang, Z., Brenner, C., 2014. VDAC phosphorylation, a lipid sensor influencing the cell fate. *Mitochondrion* 19 Pt A, 69–77. doi:10.1016/j.mito.2014.07.009
- Marzo, I., Susin, S.A., Petit, P.X., Ravagnan, L., Brenner, C., Larochette, N., Zamzami, N., Kroemer, G., 1998. Caspases disrupt mitochondrial membrane barrier function. *FEBS Lett.* 427, 198–202.
- Masliah, E., Rockenstein, E., Veinbergs, I., Mallory, M., Hashimoto, M., Takeda, A., Sagara, Y., Sisk, A., Mucke, L., 2000. Dopaminergic Loss and Inclusion Body Formation in  $\alpha$ -Synuclein Mice: Implications for Neurodegenerative Disorders. *Science* 287, 1265–1269. doi:10.1126/science.287.5456.1265
- McNaught, K.S., Jenner, P., 2001. Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 297, 191–194.
- McNaught, K.S., Jenner, P., 2000. Extracellular accumulation of nitric oxide, hydrogen peroxide, and glutamate in astrocytic cultures following glutathione depletion, complex I inhibition, and/or lipopolysaccharide-induced activation. *Biochem. Pharmacol.* 60, 979–988.
- Mizuno, Y., Matuda, S., Yoshino, H., Mori, H., Hattori, N., Ikebe, S., 1994. An immunohistochemical study on alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 35, 204–210. doi:10.1002/ana.410350212
- Mochizuki, H., Goto, K., Mori, H., Mizuno, Y., 1996. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 137, 120–123. doi:10.1016/0022-510X(95)00336-Z
- Montine, K.S., Quinn, J.F., Zhang, J., Fessel, J.P., Roberts, L.J., Morrow, J.D., Montine, T.J., 2004. Isoprostanes and related products of lipid peroxidation in neurodegenerative diseases. *Chem. Phys. Lipids* 128, 117–124. doi:10.1016/j.chemphyslip.2003.10.010
- Moos, T., Rosengren Nielsen, T., Skjørringe, T., Morgan, E.H., 2007. Iron trafficking inside the brain. *J. Neurochem.* 103, 1730–1740. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04976.x
- Muckenthaler, M.U., Galy, B., Hentze, M.W., 2008. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu. Rev. Nutr.* 28, 197–213. doi:10.1146/annurev.nutr.28.061807.155521
- Müftüoğlu, M., Elibol, B., Dalmizrak, O., Ercan, A., Kulaksiz, G., Ogüs, H., Dalkara, T., Ozer, N., 2004. Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 19, 544–548. doi:10.1002/mds.10695
- Napolitano, A., Manini, P., d'Ischia, M., 2011. Oxidation chemistry of catecholamines and neuronal degeneration: an update. *Curr. Med. Chem.* 18, 1832–1845.

- Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.-F., Gautier, C.A., Shen, J., Cookson, M.R., Youle, R.J., 2010. PINK1 Is Selectively Stabilized on Impaired Mitochondria to Activate Parkin. *PLoS Biol.* 8. doi:10.1371/journal.pbio.1000298
- Nicolesco, J., 1925. Anatomie cérébrale : les noyaux gris centraux et la région mésencéphalo-sous-optique, suivi d'un appendice sur l'anatomie pathologique de la maladie de Parkinson, par Ch. Foix,... J. Nicolesco,... Masson.
- Noda, M., 2013. Possible Contribution of Microglial Glutamate Receptors to Inflammatory Response upon Neurodegenerative Diseases. *J. Neurol. Disord.* 01. doi:10.4172/2329-6895.1000131
- Norris, E.H., Giasson, B.I., Hodara, R., Xu, S., Trojanowski, J.Q., Ischiropoulos, H., Lee, V.M.-Y., 2005. Reversible inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopaminochrome-mediated conformational alterations. *J. Biol. Chem.* 280, 21212–21219. doi:10.1074/jbc.M412621200
- Odagiri, S., Tanji, K., Mori, F., Kakita, A., Takahashi, H., Wakabayashi, K., 2012. Autophagic adapter protein NBR1 is localized in Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions and is involved in aggregate formation in  $\alpha$ -synucleinopathy. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 124, 173–186. doi:10.1007/s00401-012-0975-7
- Ostrerova-Golts, N., Petrucelli, L., Hardy, J., Lee, J.M., Farer, M., Wolozin, B., 2000. The A53T alpha-synuclein mutation increases iron-dependent aggregation and toxicity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 6048–6054.
- Pandey, U.B., Nie, Z., Batlevi, Y., McCray, B.A., Ritson, G.P., Nedelsky, N.B., Schwartz, S.L., DiProspero, N.A., Knight, M.A., Schuldiner, O., Padmanabhan, R., Hild, M., Berry, D.L., Garza, D., Hubbert, C.C., Yao, T.-P., Baehrecke, E.H., Taylor, J.P., 2007. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* 447, 860–864. doi:10.1038/nature05853
- Pearce, R.K., Owen, A., Daniel, S., Jenner, P., Marsden, C.D., 1997. Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 104, 661–677.
- Péran, P., Cherubini, A., Luccichenti, G., Hagberg, G., Démonet, J.-F., Rascol, O., Celsis, P., Caltagirone, C., Spalletta, G., Sabatini, U., 2009. Volume and iron content in basal ganglia and thalamus. *Hum. Brain Mapp.* 30, 2667–2675. doi:10.1002/hbm.20698
- Perez, F.A., Palmiter, R.D., 2005. Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2174–2179. doi:10.1073/pnas.0409598102
- Perier, C., Bové, J., Wu, D.-C., Dehay, B., Choi, D.-K., Jackson-Lewis, V., Rathke-Hartlieb, S., Bouillet, P., Strasser, A., Schulz, J.B., Przedborski, S., Vila, M., 2007. Two molecular pathways initiate mitochondria-dependent dopaminergic



- neurodegeneration in experimental Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8161–8166. doi:10.1073/pnas.0609874104
- Perry, T.L., Yong, V.W., 1986. Idiopathic Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and glutathione metabolism in the substantia nigra of patients. *Neurosci. Lett.* 67, 269–274.
- Pourova, J., Kottova, M., Voprsalova, M., Pour, M., 2010. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 198, 15–35. doi:10.1111/j.1748-1716.2009.02039.x
- Ramsay, R.R., Salach, J.I., Singer, T.P., 1986. Uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD<sup>+</sup>-linked substrates by MPP+. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134, 743–748.
- Richardson, D.R., Lane, D.J.R., Becker, E.M., Huang, M.L.-H., Whitnall, M., Suryo Rahmanto, Y., Sheftel, A.D., Ponka, P., 2010. Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 10775–10782. doi:10.1073/pnas.0912925107
- Riederer, P., Sofic, E., Rausch, W.D., Schmidt, B., Reynolds, G.P., Jellinger, K., Youdim, M.B., 1989. Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J. Neurochem.* 52, 515–520.
- Robert, G., Puissant, A., Dufies, M., Marchetti, S., Jacquet, A., Cluzeau, T., Colosetti, P., Belhacene, N., Kahle, P., Da Costa, C.A., Luciano, F., Checler, F., Auberger, P., 2012. The caspase 6 derived N-terminal fragment of DJ-1 promotes apoptosis via increased ROS production. *Cell Death Differ.* 19, 1769–1778. doi:10.1038/cdd.2012.55
- Rolfs, A., Kvietikova, I., Gassmann, M., Wenger, R.H., 1997. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J. Biol. Chem.* 272, 20055–20062.
- Salazar, J., Mena, N., Hunot, S., Prigent, A., Alvarez-Fischer, D., Arredondo, M., Duyckaerts, C., Sazdovitch, V., Zhao, L., Garrick, L.M., Nuñez, M.T., Garrick, M.D., Raisman-Vozari, R., Hirsch, E.C., 2008. Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18578–18583. doi:10.1073/pnas.0804373105
- Sato, H., Shiiya, A., Kimata, M., Maebara, K., Tamba, M., Sakakura, Y., Makino, N., Sugiyama, F., Yagami, K., Moriguchi, T., Takahashi, S., Bannai, S., 2005. Redox Imbalance in Cystine/Glutamate Transporter-deficient Mice. *J. Biol. Chem.* 280, 37423–37429. doi:10.1074/jbc.M506439200
- Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Clark, J.B., Jenner, P., Marsden, C.D., 1990. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 54, 823–827.

- Schapira, A.H., Jenner, P., 2011. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 26, 1049–1055. doi:10.1002/mds.23732
- Schapira, A.H.V., 2011. Mitochondrial pathology in Parkinson's disease. *Mt. Sinai J. Med. N. Y.* 78, 872–881. doi:10.1002/msj.20303
- Schapira, A.H.V., 2008. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 7, 97–109. doi:10.1016/S1474-4422(07)70327-7
- Schildknecht, S., Karreman, C., Pörtl, D., Efrémova, L., Kullmann, C., Gutbier, S., Krug, A., Scholz, D., Gerding, H.R., Leist, M., 2013. Generation of genetically-modified human differentiated cells for toxicological tests and the study of neurodegenerative diseases. *ALTEX* 30, 427–444.
- Schmidt, M., Goebeler, M., Posern, G., Feller, S.M., Seitz, C.S., Bröcker, E.-B., Rapp, U.R., Ludwig, S., 2000a. Ras-independent Activation of the Raf/MEK/ERK Pathway upon Calcium-induced Differentiation of Keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 275, 41011–41017. doi:10.1074/jbc.M003716200
- Schmidt, N., Fergar, B., 2001. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 108, 1263–1282.
- Scholz, D., Pörtl, D., Genewsky, A., Weng, M., Waldmann, T., Schildknecht, S., Leist, M., 2011. Rapid, complete and large-scale generation of post-mitotic neurons from the human LUHMES cell line: LUHMES as widely applicable neuronal model system. *J. Neurochem.* 119, 957–971. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07255.x
- Schüle, B., Pera, R.A.R., Langston, J.W., 2009. Can cellular models revolutionize drug discovery in Parkinson's disease? *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 1043–1051. doi:10.1016/j.bbadis.2009.08.014
- Semenza, G.L., 2000. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* 14, 1983–1991.
- Shachar, D.B., Kahana, N., Kampel, V., Warshawsky, A., Youdim, M.B.H., 2004. Neuroprotection by a novel brain permeable iron chelator, VK-28, against 6-hydroxydopamine lesion in rats. *Neuropharmacology* 46, 254–263.
- Sidhu, A., Wersinger, C., Vernier, P., 2004. alpha-Synuclein regulation of the dopaminergic transporter: a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *FEBS Lett.* 565, 1–5. doi:10.1016/j.febslet.2004.03.063
- Silvestri, L., Caputo, V., Bellacchio, E., Atorino, L., Dallapiccola, B., Valente, E.M., Casari, G., 2005. Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3477–3492. doi:10.1093/hmg/ddi377
- Simpson, I.A., Ponnuru, P., Klinger, M.E., Myers, R.L., Devraj, K., Coe, C.L., Lubach, G.R., Carruthers, A., Connor, J.R., 2015. A novel model for brain iron uptake:

- introducing the concept of regulation. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 48–57. doi:10.1038/jcbfm.2014.168
- Skouta, R., Dixon, S.J., Wang, J., Dunn, D.E., Orman, M., Shimada, K., Rosenberg, P.A., Lo, D.C., Weinberg, J.M., Linkermann, A., Stockwell, B.R., 2014a. Ferrostatins Inhibit Oxidative Lipid Damage and Cell Death in Diverse Disease Models. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 4551–4556. doi:10.1021/ja411006a
- Song, N., Wang, J., Jiang, H., Xie, J., 2010. Ferroportin 1 but not hephaestin contributes to iron accumulation in a cell model of Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 332–341. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.004
- Sonsalla, P.K., Heikkila, R.E., 1986. The influence of dose and dosing interval on MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 129, 339–345.
- Srikanth, P., Young-Pearse, T.L., 2014. Stem Cells on the Brain: Modeling Neurodevelopmental and Neurodegenerative Diseases Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *J. Neurogenet.* 28, 5–29. doi:10.3109/01677063.2014.881358
- Stefanis, L., Larsen, K.E., Rideout, H.J., Sulzer, D., Greene, L.A., 2001. Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 9549–9560.
- Strauss, K.M., Martins, L.M., Plun-Favreau, H., Marx, F.P., Kautzmann, S., Berg, D., Gasser, T., Wszolek, Z., Müller, T., Bornemann, A., Wolburg, H., Downward, J., Riess, O., Schulz, J.B., Krüger, R., 2005. Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2099–2111. doi:10.1093/hmg/ddi215
- Su, J.H., Anderson, A.J., Cummings, B.J., Cotman, C.W., 1994. Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 5, 2529–2533.
- Sun, Y., Vashisht, A.A., Tchieu, J., Wohlschlegel, J.A., Dreier, L., 2012a. Voltage-dependent Anion Channels (VDACs) Recruit Parkin to Defective Mitochondria to Promote Mitochondrial Autophagy. *J. Biol. Chem.* 287, 40652–40660. doi:10.1074/jbc.M112.419721
- Tanaka, Y., Engelender, S., Igarashi, S., Rao, R.K., Wanner, T., Tanzi, R.E., Sawa, A., Dawson, V., Dawson, T.M., Ross, C.A., 2001. Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* 10, 919–926.
- Theil, E.C., 2004. Iron, ferritin, and nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 24, 327–343. doi:10.1146/annurev.nutr.24.012003.132212

- Thomas, B., Beal, M.F., 2007. Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 16 Spec No. 2, R183–194. doi:10.1093/hmg/ddm159
- Todorich, B., Zhang, X., Connor, J.R., 2011. H-ferritin is the major source of iron for oligodendrocytes. *Glia* 59, 927–935. doi:10.1002/glia.21164
- Tofaris, G.K., Layfield, R., Spillantini, M.G., 2001. alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome. *FEBS Lett.* 509, 22–26.
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M.A., Valle, N.R.-D., Huang, P., 2008. Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1343–1374. doi:10.1089/ars.2007.1957
- Triplett, J.C., Zhang, Z., Sultana, R., Cai, J., Klein, J.B., Büeler, H., Butterfield, D.A., 2015a. Quantitative expression proteomics and phosphoproteomics profile of brain from PINK1 knockout mice: insights into mechanisms of familial Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 133, 750–765. doi:10.1111/jnc.13039
- Uhl, G.R., Li, S., Takahashi, N., Itokawa, K., Lin, Z., Hazama, M., Sora, I., 2000. The VMAT2 gene in mice and humans: amphetamine responses, locomotion, cardiac arrhythmias, aging, and vulnerability to dopaminergic toxins. *FASEB J.* 14, 2459–2465. doi:10.1096/fj.00-0205rev
- Uversky, V.N., 2007. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J. Neurochem.* 103, 17–37. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04764.x
- Uversky, V.N., Li, J., Fink, A.L., 2001a. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular NK between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J. Biol. Chem.* 276, 44284–44296. doi:10.1074/jbc.M105343200
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Van der Perren, A., Toelen, J., Casteels, C., Macchi, F., Van Rompuy, A.-S., Sarre, S., Casadei, N., Nuber, S., Himmelreich, U., Osorio Garcia, M.I., Michotte, Y., D'Hooge, R., Bormans, G., Van Laere, K., Gijsbers, R., Van den Haute, C., Debyser, Z., Baekelandt, V., 2015. Longitudinal follow-up and characterization of a robust rat model for Parkinson's disease based on overexpression of alpha-synuclein with adeno-associated viral vectors. *Neurobiol. Aging* 36, 1543–1558. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.11.015
- Vaughn, A.E., Deshmukh, M., 2008. Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. *Nat. Cell Biol.* 10, 1477–1483. doi:10.1038/ncb1807

- Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Loo, G.V., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W., Vandenabeele, P., 1998. Inhibition of Caspases Increases the Sensitivity of L929 Cells to Necrosis Mediated by Tumor Necrosis Factor. *J. Exp. Med.* 187, 1477–1485. doi:10.1084/jem.187.9.1477
- Volpe, J.J., 2001. Neurobiology of Periventricular Leukomalacia in the Premature Infant. *Pediatr. Res.* 50, 553–562. doi:10.1203/00006450-200111000-00003
- Von Coelln, R., Thomas, B., Savitt, J.M., Lim, K.L., Sasaki, M., Hess, E.J., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 2004. Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10744–10749. doi:10.1073/pnas.0401297101
- Wakabayashi, K., Mori, F., Takahashi, H., 2006. Progression patterns of neuronal loss and Lewy body pathology in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.*, Proceedings of the 1st International Symposium on Dopaminergic and Nondopaminergic Mechanisms in Parkinson's Disease (ISDNMPD) Proceedings of the 1st International Symposium on Dopaminergic and Nondopaminergic Mechanisms in Parkinson's Disease (ISDNMPD) 12, Supplement 2, S92–S98. doi:10.1016/j.parkreldis.2006.05.028
- Ward, R.J., Dexter, D.T., Crichton, R.R., 2015. Neurodegenerative diseases and therapeutic strategies using iron chelators. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 31, 267–273. doi:10.1016/j.jtemb.2014.12.012
- Weinreb, O., Mandel, S., Youdim, M.B.H., Amit, T., 2013. Targeting dysregulation of brain iron homeostasis in Parkinson's disease by iron chelators. *Free Radic. Biol. Med.* 62, 52–64. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.017
- Wen-Sheng, W., 2006. Protein kinase C alpha trigger Ras and Raf-independent MEK/ERK activation for TPA-induced growth inhibition of human hepatoma cell HepG2. *Cancer Lett.* 239, 27–35. doi:10.1016/j.canlet.2005.07.034
- Wersinger, C., Chen, J., Sidhu, A., 2004. Bimodal induction of dopamine-mediated striatal neurotoxicity is mediated through both activation of D1 dopamine receptors and autoxidation. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 124–137. doi:10.1016/j.mcn.2003.10.002
- West, A.P., Brodsky, I.E., Rahner, C., Woo, D.K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Walsh, M.C., Choi, Y., Shadel, G.S., Ghosh, S., 2011. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 472, 476–480. doi:10.1038/nature09973
- Wheeler, H.E., Wing, C., Delaney, S.M., Komatsu, M., Dolan, M.E., 2015. Modeling Chemotherapeutic Neurotoxicity with Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neuronal Cells. *PLoS ONE* 10, e0118020. doi:10.1371/journal.pone.0118020
- Wong, B.X., Ayton, S., Lam, L.Q., Lei, P., Adlard, P.A., Bush, A.I., Duce, J.A., 2014. A comparison of ceruloplasmin to biological polyanions in promoting the

- oxidation of Fe<sup>2+</sup> under physiologically relevant conditions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1840, 3299–3310. doi:10.1016/j.bbagen.2014.08.006
- Wong, B.X., Duce, J.A., 2014. The iron regulatory capability of the major protein participants in prevalent neurodegenerative disorders. *Front. Pharmacol.* 5. doi:10.3389/fphar.2014.00081
- Wong, E., Cuervo, A.M., 2010. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat. Neurosci.* 13, 805–811. doi:10.1038/nn.2575
- Wüllner, U., Kornhuber, J., Weller, M., Schulz, J.B., Löschmann, P.A., Riederer, P., Klockgether, T., 1999a. Cell death and apoptosis regulating proteins in Parkinson's disease--a cautionary note. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 97, 408–412.
- Xie, H., Hu, L., Li, G., 2010. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin. Med. J. (Engl.)* 123, 1086–1092.
- Xie, Z., Klionsky, D.J., 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* 9, 1102–1109. doi:10.1038/ncb1007-1102
- Xuan, Q., Xu, S.-L., Lu, D.-H., Yu, S., Zhou, M., Uéda, K., Cui, Y.-Q., Zhang, B.-Y., Chan, P., 2011. Increased expression of  $\alpha$ -synuclein in aged human brain associated with neuromelanin accumulation. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 118, 1575–1583. doi:10.1007/s00702-011-0636-3
- Yagoda, N., von Rechenberg, M., Zaganjor, E., Bauer, A.J., Yang, W.S., Fridman, D.J., Wolpaw, A.J., Smukste, I., Peltier, J.M., Boniface, J.J., Smith, R., Lessnick, S.L., Sahasrabudhe, S., Stockwell, B.R., 2007a. RAS–RAF–MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature* 447, 865–869. doi:10.1038/nature05859
- Yang, W.S., Sriramaratnam, R., Welsch, M.E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V.S., Cheah, J.H., Clemons, P.A., Shamji, A.F., Clish, C.B., Brown, L.M., Girotti, A.W., Cornish, V.W., Schreiber, S.L., Stockwell, B.R., 2014a. Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4. *Cell* 156, 317–331. doi:10.1016/j.cell.2013.12.010
- Yang, W.S., Stockwell, B.R., 2008. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. *Chem. Biol.* 15, 234–245. doi:10.1016/j.chembiol.2008.02.010
- Yin, X., Ren, M., Jiang, H., Cui, S., Wang, S., Jiang, H., Qi, Y., Wang, J., Wang, X., Dong, G., Leeds, P., Chuang, D.-M., Feng, H., 2015. Downregulated AEG-1 together with inhibited PI3K/Akt pathway is associated with reduced viability of motor neurons in an ALS model. *Mol. Cell. Neurosci.* 68, 303–313. doi:10.1016/j.mcn.2015.08.009

- Yoo, S.-E., Chen, L., Na, R., Liu, Y., Rios, C., Van Remmen, H., Richardson, A., Ran, Q., 2012a. Gpx4 ablation in adult mice results in a lethal phenotype accompanied by neuronal loss in brain. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1820–1827. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.043
- Yoritaka, A., Hattori, N., Uchida, K., Tanaka, M., Stadtman, E.R., Mizuno, Y., 1996. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2696–2701.
- Youdim, M.B.H., Edmondson, D., Tipton, K.F., 2006. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 295–309. doi:10.1038/nrn1883
- Youdim, M.B.H., Riederer, P.F., 2004. A review of the mechanisms and role of monoamine oxidase inhibitors in Parkinson's disease. *Neurology* 63, S32–35.
- Yu, Y., Xie, Y., Cao, L., Yang, L., Yang, M., Lotze, M.T., Zeh, H.J., Kang, R., Tang, D., 2015. The ferroptosis inducer erastin enhances sensitivity of acute myeloid leukemia cells to chemotherapeutic agents. *Mol. Cell. Oncol.* 2, e1054549. doi:10.1080/23723556.2015.1054549
- Zecca, L., Fariello, R., Riederer, P., Sulzer, D., Gatti, A., Tampellini, D., 2002. The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease. *FEBS Lett.* 510, 216–220.
- Zecca, L., Wilms, H., Geick, S., Claasen, J.-H., Brandenburg, L.-O., Holzknecht, C., Panizza, M.L., Zucca, F.A., Deuschl, G., Sievers, J., Lucius, R., 2008. Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 116, 47–55. doi:10.1007/s00401-008-0361-7
- Zeevalk, G.D., Razmpour, R., Bernard, L.P., 2008a. Glutathione and Parkinson's disease: Is this the elephant in the room? *Biomed. Pharmacother.* 62, 236–249. doi:10.1016/j.biopha.2008.01.017
- Zhang, H.-M., Su, Q., 2014. PKC in developmental hypothyroid rat brain. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 35, 1161–1166. doi:10.1007/s10072-014-1716-6
- Zucca, F.A., Basso, E., Cupaioli, F.A., Ferrari, E., Sulzer, D., Casella, L., Zecca, L., 2014. Neuromelanin of the human substantia nigra: an update. *Neurotox. Res.* 25, 13–23. doi:10.1007/s12640-013-9435-y