



HAL
open science

Les propriétés antiapoptotiques et antiautophagiques du Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide assurent une protection neuronale dans des modèles in vitro et in vivo de la maladie de Parkinson

Asma Lamine-Ajili

► To cite this version:

Asma Lamine-Ajili. Les propriétés antiapoptotiques et antiautophagiques du Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide assurent une protection neuronale dans des modèles in vitro et in vivo de la maladie de Parkinson. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université; Institut Armand Frappier (Québec, Canada), 2018. Français. NNT: 2018NORMR048 . tel-01929870

HAL Id: tel-01929870

<https://theses.hal.science/tel-01929870v1>

Submitted on 21 Nov 2018

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.

Institut National de la Recherche Scientifique – INRS-Institut Armand-Frappier

et Université de Rouen

**Les propriétés antiapoptotiques et antiautophagiques du
Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide assurent une protection
neuronale dans des modèles in vitro et in vivo de la maladie de Parkinson**
Par

Asma Lamine-Ajili

Thèse présentée pour l'obtention

du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en Biologie de l'INRS

et du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en Aspects Moléculaires et Cellulaires de La
Biologie de l'Université de Rouen

Comité d'évaluation

Président du jury	Pr Jacques Bernier INRS – Institut Armand-Frappier
Examineur interne	Pr Kessen Patten INRS – Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Dr Arnaud Nicot Université de Nantes
Examineur externe	Pre Olfa Masmoudi-Kouki Faculté des Sciences de Tunis
Examineur externe	Pr Pedro D'Orléans-Juste Université de Sherbrooke
Codirecteur de recherche	Dr David Vaudry Université de Rouen
Codirecteur de recherche	Pr Alain Fournier INRS – Institut Armand-Frappier

THÈSE EN COTUTELLE INTERNATIONALE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen – Normandie (FR) et de
l'Institut National de la Recherche Scientifique – Institut Armand-Frappier, Laval (QC)

**Les propriétés antiapoptotiques et antiautophagiques du
Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide assurent une protection
neuronale dans des modèles in vitro et in vivo de la maladie de Parkinson**

Présentée et soutenue par
Asma LAMINE-AJILI

Thèse soutenue publiquement le 16 mars 2018 devant le jury composé de

Jacques BERNIER	Professeur / INRS-IAF, Canada	Examineur
Kessen PATTEN	Professeur / INRS-IAF, Canada	Examineur
Pedro D'ORLÉANS-JUSTE	Professeur / Université de Sherbrooke, Canada	Rapporteur
Arnaud NICOT	Docteur / Chargé de Recherche à l'INSERM / Université de Nantes, France	Rapporteur
Oufa MASMOUDI-KOUKI	Professeure / Faculté des sciences de Tunis, Tunisie	Examineur
Alain FOURNIER	Professeur honoraire / INRS-IAF, Canada	Codirecteur de thèse
David VAUDRY	Docteur / Chargé de Recherche à l'INSERM Université de Rouen, France	Codirecteur de thèse

Thèse dirigée par

M. David Vaudry

M. Alain Fournier

Université de Rouen, Normandie

Institut National de la Recherche Scientifique – Centre IAF



Préambule

Le présent travail *a fait l'objet d'une* cotutelle de thèse de doctorat sous les directions du **Dr David VAUDRY** du Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine de ***l'Université de Rouen, Normandie (France)***,

et du

Pr Alain Fournier du Laboratoire *d'études moléculaires* et pharmacologiques des peptides de ***l'INRS – Institut Armand-Frappier (QC, Canada)***.

Je tiens à remercier les Instituts de recherche en santé du Canada, la Fondation Armand-Frappier et le projet PeReNE Interreg IVA (Rouen), qui ont contribué financièrement à la réalisation de ces travaux de recherche.

Durant mon doctorat, j'ai bénéficié d'un soutien financier de la part de mes codirecteurs de thèse **Alain Fournier** et **David Vaudry**.

Résumés

“Le progrès de la connaissance se résume peut-être en une meilleure compréhension de notre ignorance.”

Robert Mossé

Résumé court

La maladie de Parkinson (MP) est caractérisée par la dégénérescence des neurones dopaminergiques du mésencéphale. Elle est notamment causée par des évènements délétères tels le stress oxydatif et la neuro-inflammation, et ceux-ci mènent à la destruction des neurones par divers types de mort cellulaire. Dans ce contexte, le Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide (PACAP), avec ses propriétés antiapoptotiques, anti-inflammatoires et antioxydantes et son aptitude à traverser la barrière hémocéphalique (BHE), est capable d'exercer une puissante activité neuroprotectrice dans divers modèles de la MP. Par conséquent, cette molécule est prometteuse pour le développement d'une thérapie médicamenteuse. Toutefois, ses profils pharmacologiques (actions non sélectives) et pharmacocinétiques (faible stabilité métabolique) limitent son utilisation clinique. Ainsi, dans une perspective de mise au point d'une approche thérapeutique, nous avons conçu l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27), un analogue du PACAP possédant des profils pharmacologiques et métaboliques améliorés, et avons testé son effet sur des modèles *in vitro* et *in vivo* de la MP. *In vitro* (neuroblastomes humains SH-SY5Y), l'analogue stimule efficacement la production d'AMPc et réduit l'altération de l'activité mitochondriale provoquée par un agent neurotoxique (MPP⁺; 1-méthyl-4-phénylpyridinium). *In vivo* (souris traitées avec le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine, un précurseur métabolique du MPP⁺), le PACAP et son dérivé synthétique restaurent l'expression de la tyrosine hydroxylase dans la substance noire et modulent la réponse inflammatoire. Bien que des baisses de la pression artérielle soient observées avec les deux peptides, l'intensité de la chute ainsi que sa durée sont significativement moins élevées avec l'analogue. Nos caractérisations biologiques ont donc montré que la mort neuronale causée par l'agent neurotoxique est considérablement atténuée par l'analogue peptidique. Elles ont également établi que cet effet est peut-être lié à une activité antiapoptotique soutenue. Dans un deuxième temps, nous avons exploré l'effet du PACAP sur le processus autophagique observé dans ces mêmes modèles de la MP. Nous avons ainsi démontré que le PACAP réduit significativement l'activité autophagique, comme évaluée par la production du complexe LC3-II, le rétablissement des niveaux protéiques de la p62, et la diminution de la formation

des vacuoles autophagiques. La capacité du PACAP à inhiber l'autophagie a également été observée in vitro, et ce, en inhibant l'activité de p62 induite par la rapamycine, un inducteur de l'autophagie. Ainsi, nos travaux ont conduit à la description d'une molécule dérivée du PACAP, métaboliquement stable, qui s'avère aussi puissante que le peptide natif au niveau de la neuroprotection. Ils ont aussi révélé que le PACAP possède des propriétés antiautophagiques dans des modèles de la MP.

Mots clés : maladies neurodégénératives, neurodégénérescence, maladie de Parkinson, modèles parkinsoniens in vitro et in vivo, PACAP, apoptose, antiapoptotique, autophagie, antiautophagique

Résumé

Les maladies neurodégénératives ont longtemps été considérées comme un danger non seulement pour les personnes âgées mais aussi pour une certaine proportion d'adultes suite à la découverte des formes héréditaires. Avec l'augmentation de l'espérance de vie, ces maladies constituent un problème de santé publique de plus en plus préoccupant. L'une d'entre elles, la maladie de Parkinson (MP), classée deuxième après la MA pour sa prévalence, est d'évolution lente et se manifeste sur le plan clinique par l'apparition de troubles du mouvement caractérisés par une instabilité ou une rigidité posturale, des tremblements au repos et une bradykinésie ou une akinésie. Causede par la destruction massive des neurones du mésencéphale, et plus particulièrement des neurones dopaminergiques de la substance noire (SN), l'étiologie exacte de la MP est encore peu connue. Plusieurs hypothèses ont été émises en vue d'élucider la physiopathologie de cette maladie. En particulier, de nombreuses études ont démontré le rôle causal que jouent différents processus physiopathologiques, à savoir le stress oxydatif, l'excitotoxicité et la neuro-inflammation, dans le développement d'un dysfonctionnement mitochondrial menant ultimement à une mort apoptotique progressive des neurones dopaminergiques de la SN. De plus, d'autres travaux ont rapporté une implication du processus autophagique et d'autres formes de mort cellulaire dans la dégénérescence de ces mêmes neurones. À l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif et/ou préventif contre la MP. Seule la thérapie symptomatique est utilisée auprès des patients parkinsoniens visant le soulagement des complications motrices. Ainsi, de nombreuses classes médicamenteuses basées sur le contrôle des processus délétères en lien avec l'excitotoxicité, le stress oxydatif, les événements pro-inflammatoires et apoptotiques ont été explorées afin d'arrêter la mort neuronale associée avec la MP. Parmi ces traitements, citons notamment des anti-inflammatoires et des antiapoptotiques. Cependant, aucune de ces stratégies n'est apparue comme pleinement satisfaisante, entre autres parce que plusieurs de ces substances sont incapables de franchir la barrière hémocéphalique (BHE) et/ou ne sont pas à action concertée multicible.

Compte tenu du caractère multifactoriel de la MP, il importe de rechercher une substance médicamenteuse capable non seulement de cibler l'ensemble des mécanismes délétères menant à la destruction des neurones dopaminergiques mais aussi de traverser la BHE.

Le Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) est un neuropeptide découvert initialement pour sa capacité à stimuler la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) dans des cellules hypophysaires de rat en culture. Capable d'interagir avec trois récepteurs distincts, i.e. PAC1, VPAC1 et VPAC2, le PACAP est doté de multiples actions physiologiques aussi bien sur le système nerveux central que sur les systèmes respiratoire, cardiovasculaire, digestif, immunitaire, reproducteur, etc. De nombreux effets neuroprotecteurs du PACAP ont été observés dans divers modèles d'atteintes neurologiques incluant la MP. Ces effets sont principalement médiés par le récepteur PAC1. En particulier, il fut démontré que le PACAP protège les neurones corticaux de rat contre l'excitotoxicité induite par le glutamate. De plus, grâce à son pouvoir antioxydant, celui-ci est capable de contrer le stress oxydatif induit par l' H_2O_2 sur plusieurs types cellulaires. Egalement, de puissantes actions anti-inflammatoires ont été observées avec le PACAP dans des paradigmes in vitro et in vivo. Il en est de même pour ses effets antiapoptotiques qui ont été abondamment documentés suite à des travaux réalisés avec plusieurs modèles cellulaires et animaux. De par sa capacité à traverser la BHE, et ses propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices permettant le contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la survie cellulaire, le PACAP apparaît comme un candidat prometteur pour le traitement de diverses atteintes cérébrales multifactorielles, incluant la MP. Néanmoins, ses profils pharmacocinétique (demi-vie dans le sang de 2-5 min) et pharmacologique (effets indésirables liés à l'activation du récepteur VPAC2), limitent son potentiel comme agent cliniquement utile. En effet, le PACAP, sous sa forme native comme médicament, serait d'une part rapidement dégradé, ce qui affecterait son efficacité comme agent neuroprotecteur et provoquerait d'autre part certains effets secondaires associés à une activation des récepteurs non-ciblés. En réponse à ces problèmes, dans le cadre d'un programme de développement d'analogues du PACAP métaboliquement stables et dépourvus d'affinité pour le récepteur VPAC2, notre équipe

a généré l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) qui, par ses propriétés, pourrait répondre à certaines limitations du PACAP.

En vue d'investiguer l'impact des modifications chimiques introduites au niveau de l'analogue, l'objectif principal de la première partie de ce projet a consisté à caractériser pharmacologiquement l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27), à étudier ses effets dans des modèles reproduisant *in vitro* et *in vivo* la MP et à évaluer sa contribution à de possibles effets secondaires liés à l'activation du récepteur VPAC2. En premier lieu, nous avons procédé à des mesures de la capacité de l'analogue à stimuler la production d'AMPc par des cellules de neuroblastomes humains SH-SY5Y et avons étudié son affinité envers les récepteurs du PACAP au moyen de lignées cellulaires exprimant de façon stable les récepteurs PAC1, VPAC1 ou VPAC2. Aussi, la stabilité métabolique de l'analogue a été mesurée en l'incubant avec la dipeptidyl peptidase IV (DPP IV), une enzyme catalysant le clivage du PACAP au niveau N-terminal. Nos résultats ont révélé que l'analogue produit efficacement de l'AMPc, nonobstant son affinité réduite envers les récepteurs du PACAP. En second lieu, nous avons évalué la propension de l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) à promouvoir la survie neuronale *in vitro* et *in vivo* en présence du 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP⁺) ou de son précurseur le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP). Nous avons ainsi observé que l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) exerce le même effet neuroprotecteur que celui mesuré avec les deux isoformes du peptide natif face à la neurotoxicité du MPP⁺, tandis que le VIP, un analogue de la superfamille du PACAP, s'est montré incapable de reproduire ce même effet. À l'avenant de son pouvoir neuroprotecteur mis en évidence *in vitro*, l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27), injecté en périphérie, induit également le même niveau de neuroprotection que celui du PACAP sur un modèle murin de la MP. En particulier, nos données ont suggéré que l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) est probablement doté d'une puissante activité antiapoptotique face à la dégénérescence des neurones dopaminergiques causée par le MPTP, et ce, en réduisant le taux d'expression de la caspase-3. Nos travaux ont également identifié une action anti-inflammatoire prononcée de l'analogue face à l'expression des cytokines pro-inflammatoires tumor necrosis factor alpha (TNF- α) et l'interleukine-6 (IL-6) induite par le MPTP. En dernier lieu, nous avons évalué l'effet de

l'analogue sur certains paramètres cardiaques dans l'optique d'étudier son impact sur les effets indésirables en rapport avec le système cardiovasculaire, et liés notamment à l'activation du récepteur VPAC2. Il s'est avéré que notre analogue a généré des effets moindres sur la pression artérielle moyenne (PAM) comparativement à ceux induits par le peptide natif.

Par ailleurs, il est bien établi que le PACAP est doté d'un éventail d'effets neuroprotecteurs en lien avec l'abolition du stress oxydatif, la réduction de la neuro-inflammation et l'inhibition de l'apoptose. Néanmoins, son impact sur le processus autophagique n'avait jamais été investigué auparavant, bien que celui-ci occupe une place significative dans la MP. Donc, dans la deuxième partie de cette étude, le PACAP a été évalué pour sa capacité à prévenir le processus autophagique induit dans des modèles expérimentaux de la MP. Nous avons ainsi clairement démontré, de par son efficacité à préserver l'intégrité neuronale, que le PACAP38 est capable de bloquer le processus autophagique en prévenant la formation de LC3-II et des vacuoles autophagiques, et en restaurant le niveau protéique de p62 (réduit préalablement par le MPP⁺). Par ailleurs, l'action antiautophagique du PACAP serait étroitement associée au processus autophagique observé au niveau des neurones puisque le peptide contrecarre l'effet de la rapamycine, un inducteur puissant de l'autophagie. En parallèle à nos travaux *in vitro*, nous avons démontré qu'*in vivo*, le PACAP favorise la survie des neurones dopaminergiques et prévient la formation de LC3-II et des autophagosomes après une agression neurotoxique avec du MPTP.

Dans l'ensemble, grâce à l'action multicible du PACAP et de l'Ac-[Phe(p)]⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27), nos données suggèrent que ces peptides peuvent être des gabarits moléculaires appropriés pour le développement de médicaments traitant de manière efficace les maladies neurodégénératives à caractère multifactoriel telle la MP.

Résumé court en anglais

Parkinson's disease (PD) is characterized by the degeneration of mesencephalic dopaminergic neurons. In particular, it is caused by deleterious events such as oxidative stress and neuro-inflammation, which lead to the destruction of neurons by several types of cell death. In this context, the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP), with its antiapoptotic, anti-inflammatory and antioxidant properties, as well as its ability to cross the blood-brain barrier (BBB), is able to exert a potent neuroprotective activity in various PD models. Therefore, this molecule is promising for the development of a PACAP-based drug therapy. However, its pharmacological (non-selective) and pharmacokinetic (low metabolic stability) profiles limit its clinical use. Thus, from the perspective of developing a therapeutic approach, we designed the analog Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27), a PACAP derivative with improved pharmacological and metabolic profiles, and tested its effects in in vitro and in vivo PD models. In vitro (SH-SY5Y human neuroblastoma cells), the analog effectively stimulates the production of cAMP and reduces the alteration of mitochondrial activity caused by a neurotoxic agent (MPP⁺; 1-methyl-4-phenylpyridinium). In vivo (mice treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, a metabolic precursor of MPP⁺), PACAP and its synthetic derivative restore tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and modulate the inflammatory response. Although decreases in blood pressure were observed with both peptides, the intensity of the fall and its duration were significantly lower with the analog. Our biological characterizations have thus shown that the neuronal death caused by the neurotoxic agent is considerably attenuated by the peptide analog. They also established that this effect may be related to sustained antiapoptotic activity. In a second step, we explored the effect of PACAP on the autophagic process observed in these same PD models. Thus, we have demonstrated that PACAP significantly reduces autophagic activity, as assessed by the production of the LC3-II complex, the restoration of the p62 protein levels, and the decreased formation of autophagic vacuoles. The ability of PACAP to impede autophagy was also observed in vitro, by the inhibition of the p62 activity produced by rapamycin, an inducer of autophagy. In summary, our work led to the description of a PACAP-derived molecule, metabolically stable, that proved to be in

neuroprotection as potent as the native peptide. Our studies also revealed that PACAP possesses antiautophagic properties in PD models.

Key words: neurodegenerative diseases, neurodegeneration, Parkinson's disease, in vitro and in vivo parkinsonian models, PACAP, apoptosis, antiapoptotic, autophagy, antiautophagic

Résumé en anglais

Neurodegenerative diseases have long been considered a risk not only for the elderly but also for a proportion of adults following the discovery of hereditary forms. As life expectancy increases, these diseases, including the well-known Parkinson's disease (PD), are a growing public health concern. PD, ranked second after Alzheimer's disease for its prevalence, slowly evolves and is depicted at the clinical level by the appearance of movement disorders characterized by postural instability or stiffness, quiescence at rest and bradykinesia or akinesia. Caused by the destruction of mesencephalon neurons, and more particularly of the dopaminergic neurons of the black substance, the exact etiology of PD remains unknown. Several hypotheses have been put forward to elucidate the pathophysiology of this disease. In particular, numerous studies have demonstrated the causal role of various pathophysiological processes, namely the oxidative stress, excitotoxicity and neuro-inflammation, in the development of mitochondrial dysfunction, which ultimately leads to progressive apoptotic death of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN). Additionally, other studies have reported the involvement of autophagy and other forms of cell death in the degeneration of these same neurons. At present, there are no curative or preventive treatments for PD. Only symptomatic therapy is used in parkinsonian patients to relieve motor complications. Thus, many drugs based on the control of deleterious processes in connection with excitotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory and apoptotic events have been explored in order to stop neuronal death associated with PD. These treatments include anti-inflammatory and antiapoptotic drugs. However, none of these strategies appeared to be fully satisfactory, one reason being that many of these substances are unable to cross the blood-brain barrier (BBB) and do not concertedly act on multiple targets. Given the multifactorial nature of PD, it is important to look for a drug substance that can, not only target all the deleterious mechanisms leading to the destruction of dopaminergic neurons, but that is also able to cross the BBB.

Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) is a neuropeptide originally discovered for its ability to stimulate the formation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in rat pituitary cells. PACAP is able to interact with three distinct receptors, i.e. PAC1, VPAC1 and VPAC2, and has numerous physiological actions on the central nervous system as well as on the respiratory, cardiovascular, digestive, immune and reproductive systems. Neuroprotective effects of PACAP have been observed in various neurological patterns including PD. These effects are mainly mediated by the PAC1 receptor. In particular, it was demonstrated that PACAP protects rat cortical neurons against glutamate-induced excitotoxicity. Moreover, due to its antioxidant power, it is capable of counteracting the oxidative stress induced by H₂O₂ in several cell types. Potent anti-inflammatory actions were observed with PACAP in vitro and in vivo paradigms. The same is true for its antiapoptotic effects, which have been extensively documented following experiments carried out on several cellular and animal models. Because of its ability to cross the BBB and its neurotrophic and neuroprotective properties that control proliferation, differentiation and cell survival, PACAP appears to be a promising candidate for the treatment of various multifactorial brain damages including PD. Nevertheless, its pharmacokinetic (half-life in blood of 2-5min) and pharmacological (undesirable effects related to the activation of the VPAC2 receptor) profiles limit its potential as a clinically useful agent. Indeed, PACAP in its native form would be a rapidly degraded drug, which would affect its effectiveness as a neuroprotective agent and would also cause some side effects associated with the activation of untargeted receptors. To address these problems and as part of a program to develop metabolically stable PACAP analogs with no affinity for the VPAC2 receptor, our team generated Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) with properties that could overcome some limitations of PACAP.

In order to investigate the impact of the chemical modifications introduced in this analog, the main objective of the first part of this project consisted in the pharmacological characterization of Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) in in vitro and in vivo PD models and the evaluation of its contribution to possible side effects related to the activation of the VPAC2 receptor. First, we measured the ability of the analog to stimulate the production of cAMP by SH-SY5Y human neuroblastoma cells and studied its affinity to PACAP

receptors using cell lines expressing the PAC1, VPAC1 or VPAC2 receptors. Second, the metabolic stability of the analog was investigated by incubating it with dipeptidyl peptidase IV (DPP IV), an enzyme catalyzing the cleavage of PACAP at the N-terminal side. Our results revealed that the analog effectively produces cAMP, although a reduced affinity to PACAP receptors. Also, we evaluated the propensity of Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) to promote neuronal survival in vitro and in vivo in the presence of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) or its precursor 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). We observed that Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) exerts the same neuroprotective effect as that measured with the two isoforms of the native peptide against the neurotoxicity of MPP⁺, whereas VIP, an analog of the PACAP superfamily, was unable to reproduce the same effect. In addition to its neuroprotective potency exhibited in vitro, the analog Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27), following a peripheral injection, also induced the same level of neuroprotection as that of PACAP on a murine model of MP. In particular, by reducing the expression of caspase-3, our data revealed that Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) might be endowed with a potent antiapoptotic activity in response to the degeneration of dopaminergic neurons caused by MPTP. Our work also identified a pronounced anti-inflammatory action of the analog against the expression of MPTP-induced pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6)). Finally, we evaluated the effect of the analog on some cardiac parameters in order to study its impact on adverse effects related to the cardiovascular system, and in particular linked to the activation of the VPAC2 receptor. It has been found that our analog has generated lesser effects on mean arterial pressure compared to those induced by the native peptide.

Furthermore, it is well established that PACAP has a range of neuroprotective effects related to the suppression of oxidative stress, the reduction of neuro-inflammation and the inhibition of apoptosis. Nevertheless, its impact on autophagy had never been investigated before, despite its significance in the PD. Therefore, in the second part of this study, PACAP was evaluated for its ability to prevent autophagic process induced in experimental models of PD. We have clearly demonstrated that PACAP38 is able to block the autophagic process by preventing the formation of LC3-II and autophagic vacuoles

and restoring the protein level of p62 (previously reduced by the MPP⁺), thus showing its efficacy in preserving neuronal integrity. Moreover, the antiautophagic action of PACAP is closely associated with the autophagic process observed at the level of the neurons since the peptide counteracts the effect of rapamycin, a potent inducer of autophagy. In parallel with our work in vitro, we have demonstrated that PACAP promotes the survival of dopaminergic neurons in vivo and prevents the formation of LC3-II and autophagosomes after neurotoxic aggression with MPTP.

Overall, due to the multi-target action of PACAP and Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27), our data suggest that these peptides may be suitable molecular templates for the development of drugs that effectively treat multifactorial neurodegenerative diseases such as PD.

Remerciements

Le présent travail n'aurait pu voir le jour sans la contribution précieuse de plusieurs personnes. Les mots à eux seuls ne suffisent à leur exprimer ma profonde gratitude.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir acquiescé à juger mon travail.

*Mes plus sincères remerciements s'adressent au professeur **Alain FOURNIER** qui a consenti à codiriger mes travaux de thèse. **Alain**, j'ai débuté mon programme de thèse alors que tu occupais le poste de directeur du centre INRS-IAF. Malgré un agenda chargé, ton encadrement enthousiaste s'est traduit par des rencontres assidues sans n'avoir jamais ressenti d'impatience. Cette ouverture s'est maintenue lorsque ton parcours t'a amené au vice-rectorat à la recherche et aux affaires académiques de l'INRS. Quand tu as repris tes fonctions de professeur-chercheur à temps plein, j'ai pu continuer à profiter de cette ouverture et de ta cordialité. Par exemple, je ne peux oublier les bons mots suite à un examen, ce qui a renforcé ma confiance et le désir de persévérer pour réussir. Je te remercie d'avoir facilité mon apprentissage de la rigueur scientifique ainsi que pour les qualités humaines que tu m'as transmises. Ce fut pour moi un réel privilège d'œuvrer dans ton laboratoire, de côtoyer ton équipe et de profiter de ton expertise et ton savoir-faire. Je suis fière de ce travail qui représente le fruit des efforts continus que nous avons déployés ensemble.*

*J'aimerais également remercier mon codirecteur de thèse, le docteur **David VAUDRY**, pour l'accueil bienveillant qu'il m'a réservé au sein de son laboratoire depuis ma maîtrise. Cette formation a été pour moi une expérience scientifique extraordinaire, qui nous a amenés au souhait de l'approfondir par le biais d'une thèse en cotutelle. **David**, les mots ne sauraient entièrement exprimer ma reconnaissance envers ta générosité et ton amabilité. Merci aussi pour tes précieux conseils et tes critiques pertinentes et constructives. Je souhaite ardemment que ce travail puisse témoigner de mon entière reconnaissance et de mon profond respect, et j'espère grandement que notre collaboration se poursuivra et demeurera couronnée de succès.*

Je tiens à remercier M. **Jacques BERNIER**, professeur au centre INRS-IAF, de son acceptation à présider le jury.

Je remercie également M. **Kessen PATTEN**, professeur au centre INRS-IAF, de sa *disponibilité afin d'agir comme membre du jury.*

Mes vifs remerciements vont aussi à M. **Pedro D'ORLÉANS-JUSTE**, professeur au *Département de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de l'Université de Sherbrooke qui, en tant qu'examineur externe, m'a prodigué de précieux conseils lors des examens effectués dans le cadre de ma thèse et qui me fait l'honneur d'évaluer ce travail.*

Toute ma gratitude au docteur **Arnaud Nicot** qui, malgré les milliers de kilomètres qui séparent Nantes du Québec, a accepté de juger cette thèse de doctorat.

*J'exprime ma profonde reconnaissance à Mme **Oifa Masmoudi-Kouki**, professeure à la Faculté des sciences de Tunis, qui me fait l'honneur pour la deuxième fois d'être mon examinatrice. Je tiens également à vous remercier de m'avoir initiée à la recherche au début de ma maîtrise. J'ai pu profiter de votre expertise dans la culture cellulaire et de vos qualités humaines hors du commun.*

*Je tiens à souligner l'aide précieuse et les conseils pertinents que m'ont prodigués nos collaborateurs **Patrick Labonté**, professeur au centre INRS-IAF, qui m'a accueillie chaleureusement au sein de son laboratoire, et son étudiant gradué, **Ahmed FAHMY**. Tous deux m'ont permis de mener à bien la deuxième partie de mon projet.*

*J'adresse également ma considération au docteur **Hubert Vaudry**, Directeur de recherche à l'Inserm, pour son implication dans la révision de mon premier article. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.*

Je tiens également à remercier vivement le docteur **Youssef Anouar**, Directeur de recherche à l'Inserm, de m'avoir accueillie au sein de l'unité Inserm U982 durant mes stages effectués dans le cadre de ma thèse de doctorat.

Mon expérience scientifique durant ce doctorat, au Québec et à Rouen, fut plus *qu'enrichissante aussi bien sur le plan humain que professionnel.*

À ce titre, je tiens à remercier tout particulièrement notre autre collaborateur, M. **David Chatenet**, maintenant professeur au centre INRS-IAF, pour tous les efforts déployés à mon égard

afin de mener à bien mes travaux de recherche durant les trois premières années de ma thèse. **David**, ton esprit critique et tes conseils judicieux m'ont permis d'approfondir mes connaissances et d'acquérir une expérience scientifique des plus instructives.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à notre chère agente de recherche et « Superwoman » **Myriam Létourneau**. Un grand merci pour tous les efforts déployés envers moi, tes qualités humaines exceptionnelles, ta bonne humeur et ton soutien excessivement généreux. Je souhaite ici t'exprimer mon profond respect et mon admiration à ton égard.

Sans oublier d'adresser mes vifs remerciements à mes collègues de laboratoire, actuels comme anciens, **Duc, Jessica, Nhung, Anh, Mai, Georges, Étienne, Julien, Mathilde, Laure, Mustapha** et **Hassan** pour tous les bons moments que nous avons vécus ensemble. Vous avez fait preuve d'un esprit d'équipe indéniable, d'une gentillesse immense et d'une grande aide. Recevez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Par la même occasion, j'adresse mes sincères remerciements à mes chers collègues de travail au sein de l'équipe du Dr David Vaudry et de l'unité U982, soit **Donovan, Colas, Céline, Magalie, Marjorie, Hélène, Alexis, Julie, Roger, Ritha, Coralie, Bénédicte, Milène, Seyma, Salma, Mounira, Zakaria** et **Huguette**. Je vous suis reconnaissante pour tous les efforts déployés à mon égard et les moments forts en émotion que nous avons partagés ensemble. Merci de faire encore partie de ma vie. Je n'oublie pas de remercier mes chers **Yacine** et **Leslie**.

Un immense merci à **Marie Jean-Luc DO REGO**, chercheur à l'Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale de Haute-Normandie (IRIB) (Université de Rouen) et **Marie Jean-Claude DO REGO**, chercheur au Service Commun d'Analyse Comportementale (SCAC) à l'Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (IRIB) (Faculté de Médecine et Pharmacie, Université de Rouen), pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée et pour m'avoir assistée dans la réalisation de la technique d'immunohistochimie et les études comportementales. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma considération distinguée.

Je tiens à souligner la générosité et l'aide précieuse que m'ont procurées mes chers amis **Amine** et **Cyrine** qui ont tant facilité mon séjour à Rouen. Trouvez ici l'expression de ma profonde considération.

*Ma gratitude va à mes très chers amis de l'INRS, **Sihem, Hanen, Kamilia, Amal, Ahlem, Maroua, Hajer, Soumaya, Hermance, Slimane, Akil, Mondher, Ghislain, Abdenour, Mohamed.** Votre soutien, votre aide et votre générosité ont rendu mes années passées à l'INRS plus qu'agréables. Merci d'être toujours là.*

Je remercie vivement **Anne PHILIPPON**, assistante de direction à l'INRS-IAF, **Josette BOURDAGES**, responsable du comptoir multiservices à l'INRS-IAF et **Michel COURCELLES**, bibliothécaire à l'INRS-IAF, de leur immense aide et de leurs conseils. Recevez ici l'expression de mon profond respect et mon admiration pour vos qualités humaines.

*J'adresse également mes plus sincères remerciements à mes chers amis **Ines et Fakher, Aroua et Amine, Shérazade et Louis, Nawel et Housseem, Najla et Atef, Amal et Arim.** Depuis mon arrivée au Québec, vous êtes une deuxième famille pour moi. Votre aide si généreuse, votre bonne humeur et votre soutien moral ont rendu les années passées ici parmi vous, plus qu'agréables. Merci d'exister dans ma vie et de le demeurer encore. Je remercie vivement mes amis **Caroline, Imen, Hend, Coraline, Manel et Zeineb.***

*À mes amies d'enfance, **Nesrine et Sana**, nous avons vécu des moments inoubliables. Je vous remercie de tout l'amour que vous m'avez procuré et de m'avoir soutenue durant vingt-sept années... et vous le faites encore. Trouvez ici l'expression de mes sentiments les plus sincères et l'assurance de mon amitié.*

*À mes chers amis que j'ai eu l'honneur de côtoyer durant tout mon cursus universitaire en Tunisie **Amina, Emna, Samia, Meriam, Malek, Dhouha, Ghofrane, Rafeh, Ryma, Hadhemi, Yosra, Salma, Seyma, Maroua, Ikram.** Je vous remercie de votre sincère amitié, de votre soutien et de votre aide si précieuse.*

*À mes chéries d'amour **Selima et Amel**, je n'oublierai jamais les moments forts que nous avons vécus ensemble. Nous étions et demeurons de véritables sœurs. Je vous suis reconnaissante de votre aide, de votre présence chaleureuse et bienveillante qui a su me conforter durant quatorze ans de connaissance.*

Toute ma gratitude à mon très cher mari **Mahdi AJILI**. Tu es le mari, le frère, le confident. *Tu as su m'épauler durant toutes ces années, tu as su tolérer et accepter mes changements*

d'humeur, tu as su me contenir dans la gestion de mon stress, tu as su quoi dire et quoi faire pour me remonter le moral, tu as fait des sacrifices que personne n'aurait pu faire. Sans ton amour sincère, sans ta générosité débordante, sans ton soutien inconditionnel, je ne pourrais accomplir ce que j'ai accompli aujourd'hui. Qu'il me soit permis de t'exprimer mon grand amour, ma reconnaissance, et mon admiration à ton égard.

À ma fille **Lobna chérie**, tu es ma raison d'être. Ton arrivée a comblé ton papa et moi. Merci de faire partie de ma vie.

À ma très chère belle famille, « les **Ajilis** et les **Melloulis** », spécialement, tonton **Zouhaier**, **Fatma**, **Maroua**, tata **Dalila**, **Moez**, un grand merci pour votre soutien et votre amour. Un remerciement spécial venant du cœur à mon très cher beau-père **Mounir**, ma très chère belle-mère **Lobna**, Paix à son âme, mon beau-frère **Rached** et ma belle-sœur **Mariem**. Je vous remercie infiniment de vos précieux conseils, de votre immense gentillesse et de votre accueil chaleureux lors de mes visites.

Je remercie vivement tous les membres de ma grande famille, grands et petits, de votre présence et de votre soutien. Un remerciement spécial à ma chère tante **Sabine**, à mon beau-frère **Seif** et mes chers neveux **Nour et Aziz**.

*J'exprime ma profonde reconnaissance et ma sincère gratitude à mes très chers parents **Hammadi** et **Neila**. Quoi que je dise, quoi que je fasse, les mots à eux seuls ne suffisent à vous remercier de tous vos sacrifices et tout l'amour que vous m'avez procuré. **Papounet**, tu as travaillé dur et tu le fais encore pour m'offrir une vie épanouie. Tu m'as fait entièrement confiance et tu as toujours respecté mes choix. Tes grandes larmes versées à chaque départ me sont chères. J'espère être à la hauteur de tes attentes et te faire honneur. **Mamaty**, je te remercie de ta présence réconfortante tout au long de ces années. Tu as su m'épauler et me guider vers le chemin du bonheur. Être mère à mon tour m'a permis d'être encore plus consciente de tous les sacrifices et efforts colossaux que tu as déployés à mon égard. Malgré la maudite maladie, tu continues à te battre et à prier pour moi pendant de longues heures. Chers parents, trouvez ici ma profonde reconnaissance et mon admiration pour les personnes que vous êtes. Je prie le Grand, jour et nuit, pour vous garder en bonne santé et vous préserver une longue vie. Je vous aime.*

*Mes sincères remerciements à mes chères sœurs **Thouraya, Ines** et **Emna**. Vous êtes des sœurs en or. Je tiens à souligner votre aide si précieuse à mon cœur, vos encouragements tout le long de ces années. Trouvez ici le témoignage de ma grande affection.*

Au final, à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, et que j'aurais oublié de citer, que ce modeste travail témoigne de ma profonde gratitude.

Table des matières

Préambule	I
Résumé court	III
Résumé	V
Résumé court en anglais	IX
Résumé en anglais	XI
Remerciements	XV
Table des matières	XXI
Liste des articles inclus dans cette thèse	XXIII
Liste des abréviations	XXIV
Liste des figures	XXVIII
Introduction	XXX
Chapitre 1: Revue de la littérature	1
1. Maladie de Parkinson	1
1.1. Bref historique	1
1.2. Anatomo-physiopathologie de la MP	2
1.3. Troubles symptomatiques associés à la MP	6
1.4. Épidémiologie de la MP.....	7
1.5. Modèles expérimentaux reproduisant la MP	8
1.5.1. Modèles liés au formes génétiques	9
1.5.2. Modèles induits par des agents toxiques	10
1.6. Désordre neuronal et mort cellulaire au cours de la MP	13
1.6.1. Stress oxydatif.....	13
1.6.2. Processus excitotoxique et implication dans la MP	16
1.6.3. Neuro-inflammation liée à la MP	18
1.6.4. Morts cellulaires observées au cours de la MP	23
1.7. Thérapies et limitations	40
2. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide	42
2.1. Généralités	42
2.2. Localisation tissulaire du PACAP	43
2.3. Récepteurs du PACAP : localisation et activation.....	44
2.4. Activités biologiques du PACAP.....	47
2.5. Effets neuroprotecteurs du PACAP.....	48
2.5.1. PACAP et maladies neurodégénératives : exemple avec la MP	50
2.5.2. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet neuroprotecteur du PACAP	53
3. PACAP : Limites pour son utilisation actuelle sur le plan clinique	55
3.1. Stabilité et transport	55
3.2. Effets indésirables liés à l'activation du VPAC2	58
3.3. PACAP et analogues : relation structure-activité	59
4. Mise en situation, hypothèses et objectifs de recherche	61

Chapitre 2 : Article 1	65
Résumé de l'article en français	66
Contribution de l'étudiant.....	67
Characterizations of a synthetic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide analog displaying potent neuroprotective activity and reduced in vivo cardiovascular side effects in a Parkinson's disease model.....	69
Chapitre 3 : Article 2.....	80
Résumé de l'article en français	81
Contribution de l'étudiant.....	82
Effect of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on the autophagic activation observed in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease	84
Chapitre 4 : Discussion.....	93
1. Caractérisation pharmacologique de l'Ac-[Phe(pI) ⁶ , Nle ¹⁷]PACAP(1-27) et étude de l'impact des modifications introduites sur des modèles de la MP	96
2. Étude de l'action du PACAP38 sur le processus autophagique activé dans des modèles in vitro et in vivo de la MP	107
Chapitre 5 : Conclusion et Perspectives.....	115
Références Bibliographiques	122

Liste des articles inclus dans cette thèse

Article 1.

Asma Lamine, Myriam Létourneau, Ngoc Duc Doan, Julie Maucotel, Alain Couvineau, Hubert Vaudry, David Chatenet, David Vaudry, Alain Fournier

“Characterizations of a synthetic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide analog displaying potent neuroprotective activity and reduced in vivo cardiovascular side effects in a Parkinson's disease model” Journal of Neuropharmacology, vol. 108, p. 440-450 (2016).

Article 2.

Asma Lamine-Ajili, Ahmed Fahmy, Myriam Létourneau, David Chatenet, Patrick Labonté, David Vaudry, Alain Fournier

“Effect of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on the autophagic activation observed in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease” Journal of BBA Molecular Basis of Disease, vol. 1862, p. 688-695 (2016).

Liste des abréviations

3-MA :	3-méthyladénine
AC :	adénylyl cyclase
ADNmt :	ADN mitochondrial
ADP :	adénosine diphosphate
Aif :	apoptosis inducing factor
AIP-1 :	actin-interacting protein
Akt :	protein kinase B
AMP :	adénosine monophosphate
AMPC :	adénosine monophosphate cyclique
AMPK :	AMP-activated protein kinase
APAF-1 :	apoptotic peptidase activating factor-1
APOE :	apolipoprotéine E
ATP :	adénosine triphosphate
ATP13A2 :	probable cation-transporting ATPase 13A2
AVC :	accidents vasculaires cérébraux
Bcl-2 :	B-cell lymphoma 2
BDNF :	brain-derived neurotrophic factor
BHE :	barrière hémocéphalique
Ca²⁺ :	calcium
CaKKβ :	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase β
CD200 :	cluster of differentiation 200
CD95 :	cluster of differentiation 95
CMA :	autophagie médiée par les protéines chaperons
COMT :	catéchol-O-méthyltransférase
CX3CL1 :	fractalkine
DA :	dopamine
DAG :	diacylglycérol
DAT :	transporteur de la dopamine
DC :	dichroïsme circulaire
DEPTOR :	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
DJ-1 :	protéine déglycase
DOPAC :	acide dihydroxyphénylacétique
DPP IV :	dipeptidyl peptidase IV
DR3 :	death receptor 3
ERK :	extracellular signal regulated kinase
ERO :	espèces réactives de l'oxygène
FKBP12 :	FK506 binding protein
FoxO3 :	forkhead box O3
GAP :	GTPase-activating protein
GB :	ganglions de la base
GBA :	β -glucocérébrosidase
GBA1 :	β -glucosidase acide
GDNF :	glial-derived neurotrophic factor

GFAP :	glial fibrillary acidic protein
GP :	globus pallidus ou pallidum
GPe :	globus pallidus externe
GPi :	globus pallidus interne
GPx :	glutathion peroxydase
Gq :	protéine G stimulant la PLC
GRP :	gastrin releasing peptide
Gs :	protéine G stimulatrice
GβL :	G protein β-subunit-like protein
H₂O₂ :	peroxyde d'hydrogène
IAPs :	protéines inhibitrices de l'apoptose
ICAM-1 :	intercellular adhesion molecule-1
IL-6 :	interleukine-6
iNOS :	oxyde nitrique synthase (forme inductible)
IP₃ :	inositol triphosphate
iv :	intraveineuse
Jmjd3 :	H3K27me3 demethylase Jumonji domain containing 3
JNK :	kinase c-Jun NH ₂ -terminale
K(ATP):	canaux potassiques sensibles à l'ATP
L-Dopa :	levodopa
LKB1 :	liver kinase B1
LPS :	lipopolysaccharides
LRKK2 :	kinase leucine-rich repeat 2
MA:	maladie d'Alzheimer
MAO-B :	monoamine oxydase B
MAP kinase :	mitogen-activated protein kinase
MAP1-LC3/LC3/Atg8 :	microtubule-associated protein 1 light chain 3
MAPT :	microtubule associated protein tau
MCP type I :	mort cellulaire de type I ou apoptose
MCP type II :	mort cellulaire autophagique
MEF2D :	transcription myocyte enhancer factor 2D
MMP3 :	métalloprotéase matricielle 3
MP :	maladie de Parkinson
MPDP :	1-méthyl-4-phényl-2,3-dihydropyridinium
MPP⁺ :	1-méthyl-4-phénylpyridinium
MPPP :	1-méthyl-4-phényl-4-propionoxy-pipéridine
MPTP :	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
mTOR :	mechanistic target of rapamycin
mTORC1 :	mTOR complex1
mTORC2 :	mTOR complex2
MTS:	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium
NADH :	nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NF-κB :	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B
NST :	noyau sous-thalamique

Nurr1 :	récepteur nucléaire
O₂^{•-} :	radical superoxyde
PAC1 :	récepteur de type 1 du PACAP
PACAP :	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide
PAM :	Pression artérielle moyenne
Parkin :	Parkinson disease protein
PARP-1 :	activation de la poly(ADP-ribose) polymérase
PC-12 :	cellules de phéochromocytomes de rat
PDE4:	Phosphodiesterase-4
PE :	phosphatidyléthanolamine
Pgc1α :	peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α
PINK :	PTEN-induced putative kinase
PIP2 :	phosphatidylinositol bisphosphate
PKA :	protéine kinase A
PKB :	protéine kinase B
PKC :	protéine kinase C
PKR :	double-stranded RNA-protein dependent kinase
PLA2G6 :	phospholipase A2 groupe VI
PLC :	phospholipase C
PRAS40 :	proline-rich Akt substrate of 40 kDa
PTS-6 :	peptide transport system
Raptor :	regulatory associated protein of mTOR
RCPG :	récepteurs couplés aux protéines G
RE :	réticulum endoplasmique
Rictor :	rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin
ROO[•] :	radicaux libres secondaires
SGK1 :	serum-and glucocorticoid-induced protein kinase 1
Sin1 :	stress-activated protein kinase-interacting protein 1
Smac :	mitochondria-derived activator of caspases
SN :	substance noire ou substantia nigra
SNC :	système nerveux central
SNpc :	substantia nigra pars compacta
SNr :	substance noire réticulée
SOD :	superoxyde dismutase
STAT3 :	transducer and activator of transcription 3
TAK1 :	transforming growth factor β activated kinase
TGF-β :	transforming growth factor β
TLR2:	toll-like receptor 2
TNF-R1 :	tumor necrosis factor receptor
TNF-α :	tumor necrosis factor α
TRAIL-R1 et II :	tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand I-II
TSC2 :	tuberous sclerosis complex
VIP :	vasoactive intestinal peptide
VMAT2 :	transporteurs vésiculaires des monoamines

VPAC1 : récepteur de type 1 du VIP
VPAC2 : récepteur de type 2 du VIP
Vps34 : vacuolar protein sorting 34

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique de la voie nigrostriée à l'état normal (A) et au cours de la MP (B).	3
Figure 2. Schéma simplifié de l'organisation anatomo-fonctionnelle des circuits des ganglions de la base (GB) à l'état normal (A) et dans la MP lors de la dégénérescence de la voie nigrostriée (B).	5
Figure 3. Schéma simplifié du mécanisme intracellulaire impliqué dans la neurotoxicité du MPTP	13
Figure 4. Représentation schématique des principales voies menant à l'apoptose.	25
Figure 5. Les principales étapes du processus autophagique i.e. l'Induction, l'Initiation, l'Élongation, et la Maturation. Modifiée d'après Kaushal et al., 2016.	30
Figure 6. Schéma illustrant les éléments des deux complexes mTOR i.e. mTORC1 et mTORC2. Modifiée d'après Limon et al., 2012.	35
Figure 7. Signalisation en aval de mTORC1 et régulation de l'autophagie. Ulk1 et Ulk2 forment un complexe stable avec Atg13, FIP200 et Atg101.	36
Figure 8. Séquences des principaux membres de la superfamille VIP/GRF/Glucagon retrouvés chez l'homme.	43
Figure 9. Comparaison des séquences en acides aminés du PACAP38 chez différentes espèces.	43
Figure 10. Représentation schématique des récepteurs du PACAP : PAC1, VPAC1 et VPAC2	47
Figure 11. Schéma simplifié du passage du PACAP à travers la BHE.	57
Figure 12. Représentation schématique illustrant les mécanismes généraux impliqués dans l'effet neuroprotecteur du PACAP au cours de la maladie de Parkinson.	100
Figure 13. Représentation schématique illustrant les différents effets induits par le PACAP et son dérivé synthétique l'Ac-[Phe(p)] ⁶ , Nle ¹⁷]PACAP(1-27) dans des modèles de la MP.	117
Figure 14. Représentation schématique illustrant les différents effets exercés par le PACAP vis-à-vis du processus autophagique induit par le MPP ⁺ /MPTP in vitro et in vivo.	118

Introduction

“Rien de grand ne s'est accompli dans le monde sans passion.”
Friedrich Hegel

Introduction

Au cours des 20 prochaines années, les atteintes neurodégénératives et neurologiques risquent de devenir la principale cause de décès et d'invalidité dans les pays industrialisés. En effet, en l'absence de traitements efficaces, les maladies neurodégénératives, et notamment la maladie de Parkinson (MP), vont très rapidement devenir un problème de santé publique majeur dans les pays occidentaux du fait de l'allongement de l'espérance de vie. La MP, d'évolution lente, se caractérise sur le plan clinique par l'apparition de troubles du mouvement avec notamment une instabilité ou une rigidité posturale, des tremblements au repos ou encore une bradykinésie ou akinésie (Ruberg et al., 1997b). Cette maladie, issue d'une destruction massive des neurones du mésencéphale et plus particulièrement des neurones dopaminergiques de la substance noire (SN) (Campbell et al., 2001), s'accompagne non seulement de symptômes moteurs mais aussi de manifestations psychiatriques telles qu'une dépression ou encore des hallucinations. Même si les causes exactes de cette maladie neurologique ne sont pas connues, de nombreuses études ont démontré le rôle causal que jouent différents processus physiopathologiques à savoir le stress oxydatif, l'excitotoxicité et la neuro-inflammation dans le développement d'un dysfonctionnement mitochondrial menant ultimement à la mort cellulaire des neurones dopaminergiques de la SN par le biais de mécanismes incluant l'apoptose et l'autophagie (Anglade et al., 1997). La L-dopa, précurseur de la dopamine (DA), constitue actuellement la thérapie palliative la plus utilisée dans le traitement de la MP. Elle vise principalement à compenser le manque en DA dans le cerveau. Ce traitement est néanmoins insatisfaisant en raison des effets secondaires provoqués. Parmi eux, et non des moindres, les dyskinésies, qui se manifestent par l'émergence de mouvements incontrôlés et involontaires (Antonini et al., 2009). Les patients ainsi traités voient alors disparaître leurs symptômes parkinsoniens mais connaissent de plus en plus de difficultés à rester debout ou même assis. Il n'existe donc pas à l'heure actuelle de traitement efficace capable de corriger ou de réduire l'évolution de cette pathologie neurodégénérative.

Le pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) est un neuropeptide qui a été initialement isolé à partir d'extraits d'hypothalamus ovins pour sa capacité à

stimuler l'adénylyl cyclase dans des cellules antéhypophysaires de rat mises en culture (Miyata et al., 1989). Le PACAP et ses récepteurs, i.e. PAC1, VPAC1 et VPAC2, sont largement distribués dans l'organisme et sont en particulier fortement exprimés dans le système nerveux central (SNC) (Vaudry et al., 2000b). De plus, ce peptide qui se présente de façon native sous deux isoformes de 38 et 27 acides aminés peut atteindre le SNC, suite à une injection périphérique, par l'intermédiaire du transporteur peptide transport system 6 (PTS-6) pour le cas du PACAP38, et par transport passif pour le PACAP27 (Banks et al., 1993, Dogrukol-Ak et al., 2004). La séquence peptidique du PACAP a été particulièrement bien conservée au cours de l'évolution suggérant que ce peptide exerce des fonctions biologiques importantes. Par exemple, il est maintenant établi que le PACAP peut contrôler la prolifération, induire la différenciation et/ou favoriser la survie cellulaire. En particulier l'effet neuroprotecteur du PACAP fut démontré dans divers modèles *in vivo* incluant la MP (Reglodi et al., 2004b) et l'ischémie cérébrale (Dejda et al., 2011, Reglodi et al., 2002), ou encore certains dommages traumatiques crâniens (Tamas et al., 2006c). Doté de puissantes activités antioxydantes (Douiri et al., 2016), antiexcitotoxiques (Tamas et al., 2006a) et anti-inflammatoires (Delgado et al., 1999), le PACAP joue un rôle prépondérant dans la survie neuronale en inhibant l'apoptose (via la voie des caspases), en modulant les processus neuro-inflammatoires et/ou en favorisant la libération de molécules neuroprotectrices, soit par la cellule en détresse ou par les cellules gliales (Brown et al., 2014, Masmoudi et al., 2003, Villalba et al., 1997). En conséquence, le PACAP, de par sa capacité à pouvoir agir en synergie sur les différentes voies biochimiques conduisant à l'apoptose, pourrait contribuer à réduire la progression de cette pathologie.

Il est maintenant établi que les activités neuroprotectrices du PACAP sont médiées principalement par les récepteurs PAC1 et VPAC1. En revanche l'activation du récepteur VPAC2 est à l'origine d'effets secondaires, ce qui constitue un obstacle pour l'utilisation du PACAP comme agent thérapeutique efficace contre la MP. De même, sa faible stabilité métabolique diminue son pouvoir à maintenir une concentration suffisante en AMPc capable de promouvoir son effet neuroprotecteur. De plus, nonobstant la panoplie d'effets neuroprotecteurs du PACAP, son impact encore méconnu sur le processus

autophagique induit au cours de la MP limite également son utilisation dans le ciblage des mécanismes physiopathologiques de la MP.

Ainsi, le projet entrepris durant ce présent travail vise dans un premier temps l'étude pharmacologique du PACAP et d'un dérivé de synthèse l'Ac-[Phe(p)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) dans des modèles reproduisant des facettes neuropathologiques de la MP induites respectivement in vitro et in vivo par le MPP⁺ et son précurseur le MPTP, de même que la comparaison de l'effet des deux peptides sur des paramètres cardiaques modulés par l'activation du récepteur VPAC2. Dans un second temps, ce projet consiste à investiguer l'impact du PACAP sur l'autophagie induite au cours de cette pathologie.

Chapitre 1: Revue de la littérature

1. Maladie de Parkinson

1.1. Bref historique

La MP fut décrite pour la première fois par le médecin britannique James Parkinson en 1817 dans sa courte monographie "An Essay on Shaking Palsy" comme un :

« Mouvement de tremblement involontaire avec une baisse de la puissance musculaire dans des parties (ou membres) inactives même quand elles sont supportées (soutenues), avec une tendance à fléchir le tronc vers l'avant et de passer du rythme de marche à la course; les sens et l'intellect demeurant intacts » (Goetz, 2011).

Cinquante ans plus tard, le célèbre neurologue français Jean-Martin Charcot, dans le cadre de son enseignement à la Salpêtrière, présente une observation de paralysie agitante accompagnée de rigidité, qu'il décide de nommer MP, comme elle est encore appelée aujourd'hui, en l'honneur de son découvreur (Pearce, 1989). Les travaux de Jean-Martin Charcot ont contribué à améliorer le diagnostic de cette maladie en la distinguant d'autres troubles neurologiques caractérisés par des tremblements, comme la sclérose en plaques (Goetz, 2011). À l'époque, l'étiologie de la MP était méconnue et elle le demeure encore au moins partiellement aujourd'hui. Néanmoins, la découverte de l'existence d'un déficit dopaminergique chez les personnes atteintes de la MP a permis l'investigation des mécanismes physiopathologiques et la recherche de moyens thérapeutiques efficaces pour traiter la MP. C'est dès la fin des années 50 que plusieurs travaux ont permis la mise au point d'un traitement palliatif contre cette pathologie. En effet, en 1957, Carlsson et son équipe ont observé chez des animaux traités à la réserpine, un hypotenseur qui génère un syndrome parkinsonien, que la levodopa (L-dopa), précurseur naturel de la DA, antagonisait l'effet tranquilisant de la réserpine (Carlsson et al., 1957). Puis à la fin de cette même année, Pletscher a démontré que la L-dopa augmente les niveaux des catécholamines dans le cerveau (Pletscher, 1957). Peu de temps après cette observation, les groupes de Carlsson et de Weil-Malherbe ont découvert séparément que les animaux traités à la réserpine présentaient un déficit catécholaminergique et qu'une administration de L-dopa restaurait préférentiellement le niveau de DA (Carlsson et al., 1958, Weil-Malherbe et al., 1959). Plusieurs groupes de recherche tels que les équipes de Bertler et Rosengren (Bertler et al., 1959) et de Sano

(Sano et al., 1959) ont ensuite étudié des cerveaux de patients ayant reçu la réserpine. Leurs données soulevaient la présence d'un déficit dopaminergique au niveau du striatum (Bertler et al., 1959) et suggéraient une implication de la DA dans le syndrome parkinsonien induit par la réserpine. En se basant sur ces données, Ehringer et Hornykiewicz ont démontré par des études en postmortem un déficit sévère de DA au niveau du striatum des cerveaux de patients parkinsoniens (Ehringer et al., 1960). Cette découverte révolutionnaire a permis d'élucider la physiopathologie de la MP et d'envisager une pharmacothérapie pour traiter la maladie (Hornykiewicz, 2010). C'est ainsi que la L-dopa a été testée pour la première fois en 1961 par Hornykiewicz sur des patients souffrant de la MP (Birkmayer et al., 1961). L'injection iv de la L-dopa visait à combler le déficit dopaminergique striatal et à réduire les troubles moteurs. Après six ans d'optimisation et d'essais, le traitement à la L-dopa était validé comme prescription pour atténuer les akinésies chez les patients atteints de la MP (Cotzias et al., 1967). Cette thérapie symptomatique a pendant plusieurs années été considérée comme la plus efficace pour traiter la MP, nonobstant les effets secondaires provoqués (Benes, 2001, Goetz, 2011, Katzenschlager et al., 2002, Marsden, 2006). Néanmoins, depuis cette époque et au fil des décennies, divers travaux anatomiques, physiologiques et biochimiques ont été poursuivis afin de non seulement améliorer les traitements palliatifs actuels (médicaments dopaminergiques et non dopaminergiques, chirurgie-neurostimulation, thérapie génique) utilisés pour le traitement de la MP mais aussi pour découvrir des stratégies préventives et curatives (Eberling et al., 2008, Voges et al., 2002).

1.2. Anato-mo-physiopathologie de la MP

Comme décrit par James Parkinson, la MP est une pathologie neurologique caractérisé par une atteinte neurodégénérative des systèmes neuronaux, principalement du système dopaminergique de la pars compacta de la SN (SNpc), accompagnée par une dépigmentation du locus niger et une accumulation de corps de Lewy (Figure 1 ; Dauer et al., 2003). Au niveau physiologique, la chute de production de DA survenant suite au dysfonctionnement des circuits neuronaux touchés, engendre sur le plan clinique l'apparition de troubles moteurs tels que l'hypertonie musculaire, le tremblement au repos

et l'akinésie. Les systèmes neuronaux non dopaminergiques qui sont altérés génèrent quant à eux de multiples complications non motrices.

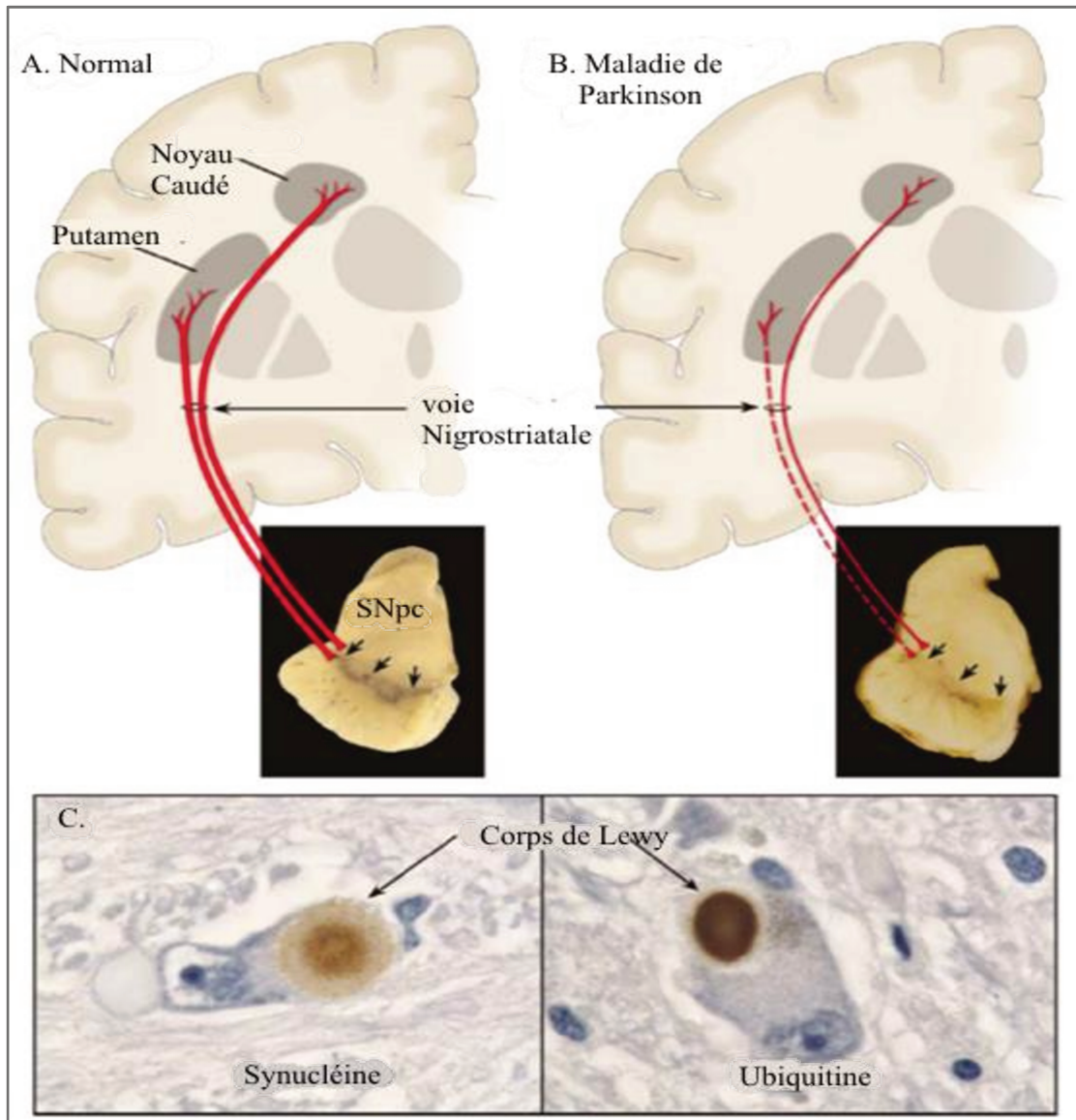


Figure 1. Représentation schématique de la voie nigrostriée à l'état normal (A) et au cours de la MP (B).

Les neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée possèdent leur corps cellulaire dans la SNpc et projettent vers le noyau caudé/putamen. (C) Les patients atteints de la MP présentent des inclusions intraneuronales (corps de Lewy) au niveau de la SNpc.

Modifiée d'après Dauer et al., 2003.

Si nous examinons de près ce qui se passe sur le plan anatomo-physiologique de ces troubles, nous relevons des circuits neuronaux complètement altérés chez un patient souffrant de la MP et intacts chez un sujet sain (Figure 2). Il s'agit du dérèglement des ganglions de la base (GB) composés des principaux noyaux et structures nerveuses : le noyau caudé et le putamen (composantes du striatum), le globus pallidus ou pallidum (GP), ainsi que la SN et le noyau sous-thalamique (NST). Les GB assurent chez un sujet sain l'activité motrice volontaire harmonieuse et font appel à deux boucles dites directe et indirecte. Comme le montre la Figure 2, la voie directe relie directement le striatum à la SN réticulée (SNr)/GP interne (GPi) et celle indirecte le relie avec la SN compacte en faisant appel à deux relais, le GP externe (GPe) et le NST. D'une part, chez un parkinsonien, l'appauvrissement en DA dérègle la voie directe en levant l'inhibition au niveau de la SNr/GPi, ce qui provoque une hyperactivité inhibitrice GABAergique des efférences nigrostriées regagnant le cortex cérébral, tout en passant par le thalamus. D'autre part, cet appauvrissement engendre sur la voie indirecte, une hyperactivité GABAergique inhibitrice touchant la voie efférente qui relie le striatum au GPe, et cause une lenteur des voies inhibitrices GABAergiques qui lient le GPe et le NST. Celle-ci est responsable d'une hyperactivité glutamatergique à ce niveau et à celui de la SNr/GPi. En conséquence, chez un patient atteint de la MP, on observe une amplification de l'activité inhibitrice des voies efférentes, alors que chez un sujet sain cette activité est inhibée par les voies dopaminergiques nigrostriées, induite par la libération de la DA qui agit via son récepteur D1 sur la voie directe et via son récepteur D2 sur celle indirecte (Fraix, 2004, Hamani et al., 2003).

D'un point de vue fonctionnel, la dégénérescence des systèmes neuronaux observée dans la MP serait à l'origine de multiples symptômes. Ceux-ci sont décrits succinctement dans la section qui suit.

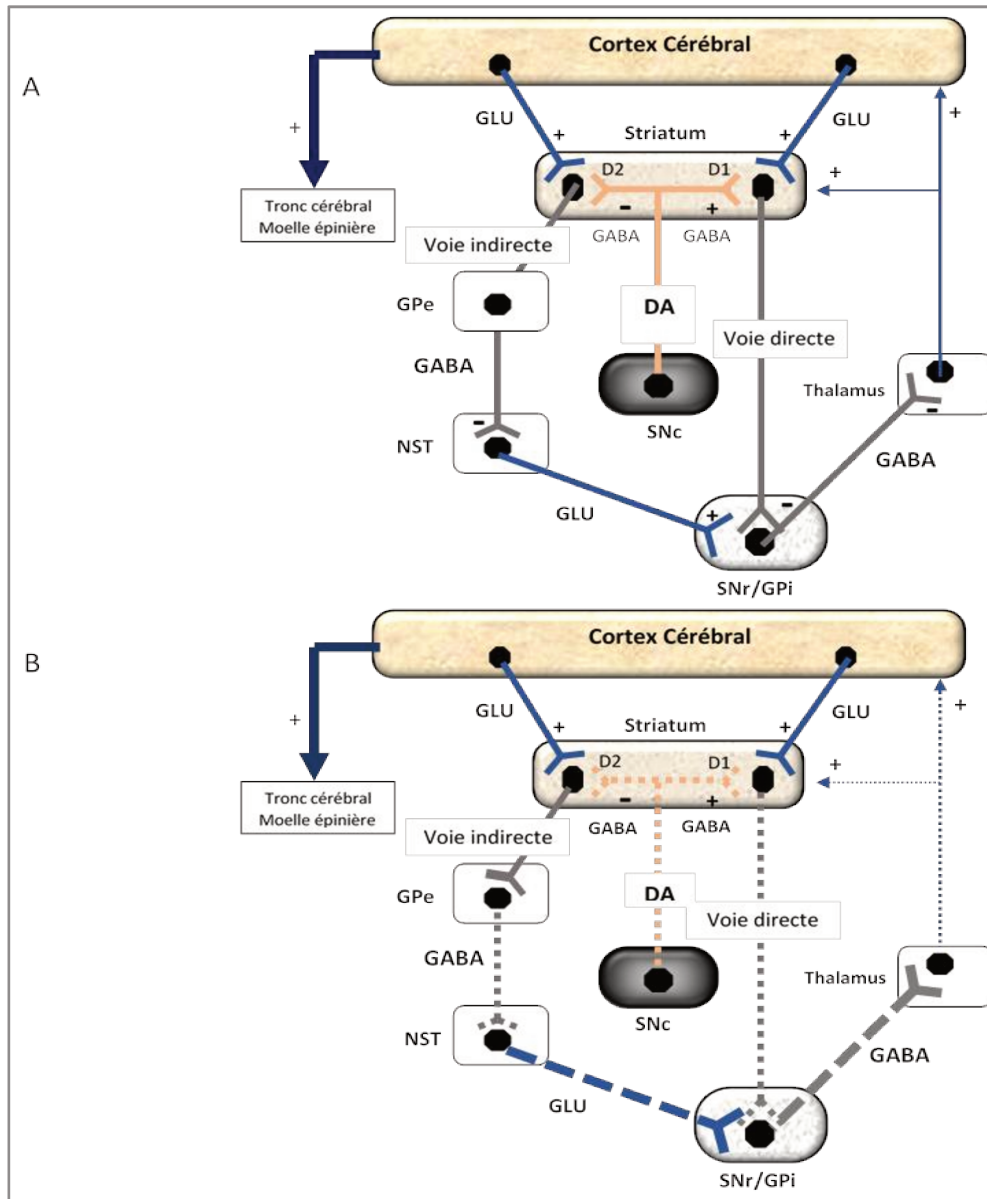


Figure 2. Schéma simplifié de l'organisation anatomo-fonctionnelle des circuits des ganglions de la base (GB) à l'état normal (A) et dans la MP lors de la dégénérescence de la voie nigrostriée (B).

SNc : substance noire compacte, SNr : substance noire réticulée, NST : noyau subthalamique, GPe : globus pallidus externe, GPi : globus pallidus interne, DA : dopamine, GLU : glutamate ; GABA : acide gamma-aminobutyrique. Modifiée d'après Fraix, 2004.

Voie dopaminergique; ———> Voie glutamatergique; ———> Voie GABAergique; ———>

Voie hypoactive;> Voie hyperactive; - - ->

1.3. Troubles symptomatiques associés à la MP

Avec la progression de la MP, les différentes composantes du système limbique, végétatif et somato-moteur dégénèrent et leurs impacts sur l'ensemble du corps se traduit par l'apparition de troubles ou symptômes moteurs et non-moteurs caractérisant chaque stade de la maladie et son évolution (Braak et al., 2004). Selon Hoehn et Yarh, chaque parkinsonien est évalué sur une échelle arbitraire de stades allant de 1 à 5. Les 5 stades définis par ces chercheurs sont caractérisés par un avancement plus ou moins précis de l'évolution de la maladie étant donné sa grande variabilité (Hoehn et al., 1967). Les troubles symptomatiques apparaissent dès le début de la maladie (stade 1) et se caractérisent par des tremblements au repos, une rigidité et une lenteur des mouvements, uniquement de façon unilatérale. Avec l'avancement de la maladie, les symptômes apparus dans un premier temps d'un côté, se retrouvent ensuite au niveau du côté opposé du corps avec en plus des complications au niveau du regard, de la voix et du langage (stade 2). Plus tardivement, une rigidité musculaire et une instabilité posturale vont se manifester et se traduire par des troubles de l'équilibre qui compliquent davantage la vie du parkinsonien et de son entourage (stade 3, 4 et 5 ; Hindle, 2010). Sur le plan physiologique, l'ensemble de ces troubles moteurs est causé par un déficit en DA, lequel provoque une perte des tonus inhibiteurs ou excitateurs entraînant ainsi le dérèglement de la boucle des GB responsable du contrôle du mouvement (Figure 2B). Toutefois, au cours de la MP, la neurodégénérescence ne concerne pas seulement le système dopaminergique mais affecte également d'autres systèmes tels que les systèmes sérotoninergiques, cholinergiques, glutamatergiques, ou encore adrénnergiques, avec pour conséquence l'apparition du parkinsonisme non-moteur. Ces troubles non-moteurs qui peuvent entraîner une dépression, des dysfonctionnements cognitifs et sensoriels, des troubles gastro-intestinaux, des désordres urogénitaux, des problèmes de thermorégulation, des dysfonctionnements cardiaques, une hypotension orthostatique, un myosis pupillaire, etc. sont observés dès le début de la maladie et vont progresser en même temps que celle-ci (Aarsland et al., 2009, Aarsland et al., 2007, Pathak et al., 2006, Poewe, 2008).

1.4. Épidémiologie de la MP

La MP est la deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente à l'échelle mondiale après la maladie d'Alzheimer (MA) avec une prévalence globale de 0,1% dans l'ensemble de la population (A. Lee et al., 2016, Pathak et al., 2006). Elle touche principalement la population âgée avec une prévalence qui atteint 1 à 2% chez les personnes âgées de plus de 65 ans. Seulement 5% des cas sont liés à une forme héréditaire de la maladie, tandis que 95% des patients sont atteints d'une forme sporadique idiopathique (Klein et al., 2007).

Bien que des facteurs génétiques et/ou environnementaux semblent être impliqués dans la neurodégénérescence des neurones dopaminergiques, l'étiologie précise de cette maladie reste encore méconnue. Parmi les facteurs de susceptibilité souvent associés à la pathogenèse de la maladie, on retrouve un polymorphisme du gène α -synucléine (PARK1/PARK4) (Maraganore et al., 2006), et des mutations touchant les gènes kinase leucine-rich repeat 2 (LRKK2 ; Kachergus et al., 2005), Parkin (Dawson et al., 2010, C. Wang et al., 2010), PTEN-induced putative kinase (PINK1 ; Morais et al., 2009) et protéine déglycase (DJ-1 ; Abou-Sleiman et al., 2003). Selon la nature de la mutation ayant touché chacun de ces gènes, les deux formes de la maladie peuvent surgir. Néanmoins, certaines mutations d'autres gènes peuvent aussi être à l'origine d'une forme familiale (probable cation-transporting ATPase 13A2 (ATP13A2) et phospholipase A2 groupe VI (PLA2G6) ou sporadique (apolipoprotéine E (APOE), β -glucocérébrosidase (GBA), catéchol-O-méthyltransférase (COMT) et microtubule-associated protein tau (MAPT ; Romo-Gutierrez et al., 2015).

Par ailleurs, les facteurs environnementaux représentent également des facteurs de risque dans l'apparition de la MP. En effet, plusieurs travaux ont démontré qu'une exposition prolongée à différents pesticides (Allen et al., 2013, Ascherio et al., 2006) et herbicides tels que les organochlorés et les phosphates alkylés (Seidler et al., 1996), le manganèse (Jankovic, 2005), le paraquat (McCormack et al., 2002, Prasad et al., 2007), ou encore la roténone (Betarbet et al., 2000), entraînait l'apparition de la MP. Par exemple, la roténone et le paraquat induisent in vivo une neurodégénérescence dopaminergique via l'inhibition du complexe-I de la mitochondrie (McCormack et al.,

2002, Sherer et al., 2003). Ces données ont également été consolidées par une étude, publiée dans le journal « *Annals of Neurology* », qui a soulevé l'existence d'un lien étroit entre l'usage des pesticides chez des travailleurs et la MP puisque la prévalence y est 1,8 fois plus élevée que dans le reste de la population (Elbaz et al., 2009).

En outre, l'exposition à différentes drogues incluant la méthamphétamine et le 1-méthyl-4-phényl-4-propionoxy-pipéridine (MPPP) constitue un autre facteur de risque environnemental qui peut sans aucun doute entraîner l'apparition de la MP. Parmi ces drogues, nous pouvons particulièrement souligner le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP), une substance chimique de synthèse ayant vu le jour au début des années 1980 (Davis et al., 1979). Cette dernière est capable d'induire une dégénérescence nigrale non seulement chez l'homme mais aussi chez plusieurs espèces animales (Burns et al., 1984, Heikkila et al., 1984, Langston et al., 1983). Tout comme le paraquat et la roténone, le 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP⁺), le métabolite actif du MPTP, induit la mort neuronale en inhibant le complexe I de la mitochondrie (Cleeter et al., 1992).

En définitive, même si sa cause n'est pas encore totalement établie, la MP semble être la résultante d'une combinaison de facteurs de risques génétiques et environnementaux qui induisent, entre autres, un stress oxydatif et un dysfonctionnement mitochondrial qui sont à l'origine de la dégénérescence des neurones dopaminergiques (Polito et al., 2016, Takahashi et al., 2009).

1.5. Modèles expérimentaux reproduisant la MP

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la MP, il a été nécessaire de développer des modèles expérimentaux reproduisant cette pathologie. Actuellement, il existe des modèles liés aux formes génétiques, faisant appel à des animaux transgéniques avec des gènes impliqués dans l'apparition de la MP (Dave et al., 2014, Lauwers et al., 2003, Michael K Lee et al., 2002), et d'autres où la maladie est induite par des agents neurotoxiques comme certains pesticides (Francesca Cicchetti et al., 2005), la 6-OHDA (Sauer et al., 1994) ou des drogues tels l'amphétamine (Wagner et al., 1979) et le MPTP (Kowall et al., 2000).

1.5.1. Modèles liés aux formes génétiques

À date, 10% des cas de la MP sont d'origine familiale. Parmi les gènes qui sont principalement impliqués dans cette forme, nous retrouvons notamment ceux de l' α -synucléine, de la LRKK2, de PARKIN, de la DJ-1 et de PINK1. Ces gènes sont les plus fréquemment ciblés pour générer des modèles liés aux formes familiales de la maladie puisqu'ils jouent un rôle causal dans l'apparition de la MP familiale (Jagmag et al., 2016). Plusieurs études ont été entreprises afin de révéler le rôle qu'occupent les protéines codées par ces gènes. À ce chapitre, la fonction exacte de l' α -synucléine demeure à date méconnue. Néanmoins, des travaux antérieurs ont révélé un effet neurotoxique des formes sauvage et mutée de la protéine quand elles sont injectées chez la souris et le rat (Oliveras-Salvá et al., 2013). Cet effet est accompagné de troubles de la fonction motrice. Pour sa part, la LRKK2 est impliquée dans la forme autosomale de la MP (Funayama et al., 2002). Des souris invalidées pour son gène ont montré une accumulation et une agrégation anormale de certaines protéines, incluant l' α -synucléine (Xianting Li et al., 2007b). De même pour cette kinase, peu de données sont disponibles afin de mettre en évidence le rôle qu'elle remplit au sein de la cellule.

Par ailleurs, parmi les modèles d'animaux transgéniques utilisés pour mimer in vivo des caractéristiques physiopathologiques de la MP, une stratégie consiste en l'injection à des animaux (généralement des rongeurs), d'un vecteur (ex : lentivirus) contenant les formes sauvage et mutée d'un gène ciblé afin qu'il soit efficacement exprimé au niveau du SNC (Bianco et al., 2002, Daher et al., 2009). À date, on compte plus de 25 types de modèles transgéniques de souris caractérisés pour le gène de l' α -synucléine et 10 qui ont été optimisés chez le rat. De même pour LRKK2, PARKIN, DJ-1 et PINK1, divers modèles transgéniques de souris et de rat ont été développés mais leurs nombres sont inférieurs à ceux produits pour l' α -synucléine (Jagmag et al., 2016). Dans ce contexte, il importe de mentionner qu'une même mutation induite chez différents modèles transgéniques (souris ou rat) peut avoir un impact distinct sur le développement d'aspects physiopathologiques liés à la MP. Par exemple, le modèle de type WT/A30P/A53T (WT : α -synucléine humaine ; A30P : mutation C88G ; A53T : mutation G209A) ne génère chez la souris aucun mécanisme délétère lié à la pathologie (Bianco et al., 2002). En revanche, chez le rat, ce même modèle cause une dégénérescence des neurones dopaminergiques

avec l'apparition d'inclusions cytoplasmiques (Matsuoka et al., 2001). Bien que ces paradigmes reproduisent des mutations humaines impliquées dans la forme familiale de la MP, certaines contraintes, incluant la variabilité de réponse inter-espèces et la réduction des caractéristiques physiopathologiques associées à la MP, peuvent limiter leur utilisation en vue d'explorer les mécanismes étiologiques de la MP.

1.5.2. Modèles induits par des agents toxiques

1.5.2.1. Les pesticides

Certains pesticides tels que le paraquat et la roténone sont utilisés pour mimer la maladie de Parkinson. Malgré une forte similitude structurale avec le MPP⁺, le paraquat induit des effets toxiques différents. Ainsi, contrairement au MPP⁺, le paraquat provoque la mort neuronale par la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et il stimule la formation de corps de Lewy (Uversky et al., 2001). Quand celui-ci est injecté au niveau du cerveau, il induit la dégénérescence de populations neuronales retrouvées au niveau de différentes zones cérébrales. En revanche, quand il est administré par voie systémique, le paraquat peut causer la perte des neurones dopaminergiques (Brooks et al., 1999). Les données relatives à ces observations sont par contre contradictoires. En effet, les travaux de Miller et al. ont montré que le paraquat n'induit pas de changements au niveau du système dopaminergique nigrostrié (Miller, 2007). Par ailleurs, les mécanismes de neurotoxicité du paraquat demeurent peu caractérisés, et ce composé s'avère d'une efficacité variable au niveau de la mort neuronale. De plus, il traverse la BHE avec difficulté. En conséquence, son usage comme molécule pour reproduire in vitro et in vivo un aspect neuropathologique apparenté à la MP reste limité.

La roténone, un insecticide extrait de certaines plantes tropicales, est également utilisée comme modèle expérimental de la MP. Elle agit sur le complexe I de la mitochondrie et empêche ainsi le transfert des électrons (Seaton et al., 1997). Cette molécule provoque non seulement une neurodégénérescence dopaminergique progressive mais elle affecte aussi d'autres régions cérébrales. Ces lésions sont accompagnées par des manifestations non neurologiques, ce qui explique la mort de certains animaux après un traitement avec ce composé (Lapointe et al., 2004).

1.5.2.2. La 6-OHDA

La 6-OHDA, analogue hydroxylé de la dopamine, est largement utilisée pour reproduire des modèles expérimentaux de la MP. Tout comme la dopamine, la 6-OHDA possède de l'affinité pour le transporteur de la DA (DAT), ce qui amène une capture par les neurones cathécolaminergiques. Néanmoins, il faut souligner que cette voie d'entrée ne serait pas dominante et que l'initiation du processus oxydatif au niveau du neurone serait plutôt médiée par le biais d'une oxydation de la molécule en milieu extracellulaire (Hanrott et al., 2006). Nous savons que la 6-OHDA provoque la mort cellulaire par trois mécanismes distincts. En effet, la substance toxique s'auto-oxyde rapidement et promeut la production des ERO, ce qui constitue un premier processus délétère. En parallèle, elle induit la formation de H₂O₂ par oxydation de son noyau polyphénolique. Ensuite, le stress oxydatif provoqué par ces deux voies est amplifié par la présence d'ions ferreux (réaction de Fenton). Une inhibition des complexes I et IV de la chaîne mitochondriale se produit également, ce qui constitue le troisième mécanisme de toxicité par lequel la 6-OHDA provoque la mort neuronale. La 6-OHDA reproduit donc un phénotype apparenté à la MP. Toutefois, celle-ci est incapable de traverser la BHE de sorte que son administration ne peut être réalisée par voie systémique. Par conséquent, cette molécule doit être donnée au moyen d'une injection intracérébroventriculaire afin qu'elle puisse atteindre les structures cérébrales. Ceci est évidemment une manipulation animale lourde qui doit être considérée lors du choix de ce modèle expérimental de la MP.

1.5.2.3. Le MPTP

Le MPTP fut découvert suite à l'apparition de syndromes parkinsoniens irréversibles chez un jeune toxicomane qui produisait ses propres drogues. En prenant plusieurs « raccourcis » pour synthétiser le MPPP, un analogue de la mépéridine, celui-ci a généré accidentellement le MPTP (Davis et al., 1979, Goetz, 2011, Langston et al., 1983). Ce n'est que trois jours après s'être injecté du MPP⁺ que l'étudiant a commencé à développer des symptômes apparentés à la MP (Davis et al., 1979). Il a bien répondu au traitement à la L-dopa, en association avec d'autres médicaments. Malheureusement, le jeune est décédé 18 mois plus tard à cause d'une surdose de drogues. Les études postmortem alors effectuées sur le cerveau du toxicomane ont confirmé que comme au plan clinique, la substance reproduisait au niveau morphologique les caractéristiques de la MP. Ainsi,

la découverte des effets du MPTP a révolutionné les recherches réalisées sur la MP. En fait, à date, le MPTP ainsi que son métabolite actif le MPP⁺ sont les agents les plus fréquemment utilisés dans des modèles d'étude (études précliniques, in vitro, in vivo, etc.) afin de reproduire des caractéristiques très proches de la MP (Goetz, 2011).

Une fois administré, le MPTP est capable de traverser la BHE grâce à sa structure lipophile (Burns et al., 1984). Dans le cerveau, celui-ci est converti en 1-méthyl-4-phényl-2,3-dihydropyridinium (MPDP) par la monoamine oxydase B (MAO-B) présente dans les astrocytes et les neurones sérotoninergiques, puis il s'oxyde spontanément en son métabolite actif et neurotoxique, le MPP⁺ (Chiueh et al., 1984, Markey et al., 1984). Ce dernier est ensuite libéré par les astrocytes puis capté grâce au DAT par les neurones, où il s'accumule dans les mitochondries. En atteignant des concentrations mitochondriales élevées, il se combine à la NADH déshydrogénase (complexe I) et bloque la phosphorylation oxydative, ce qui engendre une déplétion en ATP et une diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial (Singer et al., 1988). Dès lors, ces perturbations mettent en place un ensemble d'évènements délétères incluant la formation de radicaux libres qui entraînent la mort neuronale (Figure 3 ; Anantharam et al., 2007, C. S. Lee et al., 2007, Mizuno et al., 1990, Obata et al., 2002, Packer et al., 1996). Bien que le MPP⁺ induise des altérations caractéristiques de la voie intrinsèque mitochondriale, il peut également déclencher l'activation de la caspase-8, une enzyme connue comme initiatrice de la voie extrinsèque. Néanmoins, il semble que cette dernière soit en fait activée en aval du recrutement de la voie intrinsèque mitochondriale (Perier et al., 2012). Les voies de l'apoptose seront décrites dans la section (1.6.4.1.).

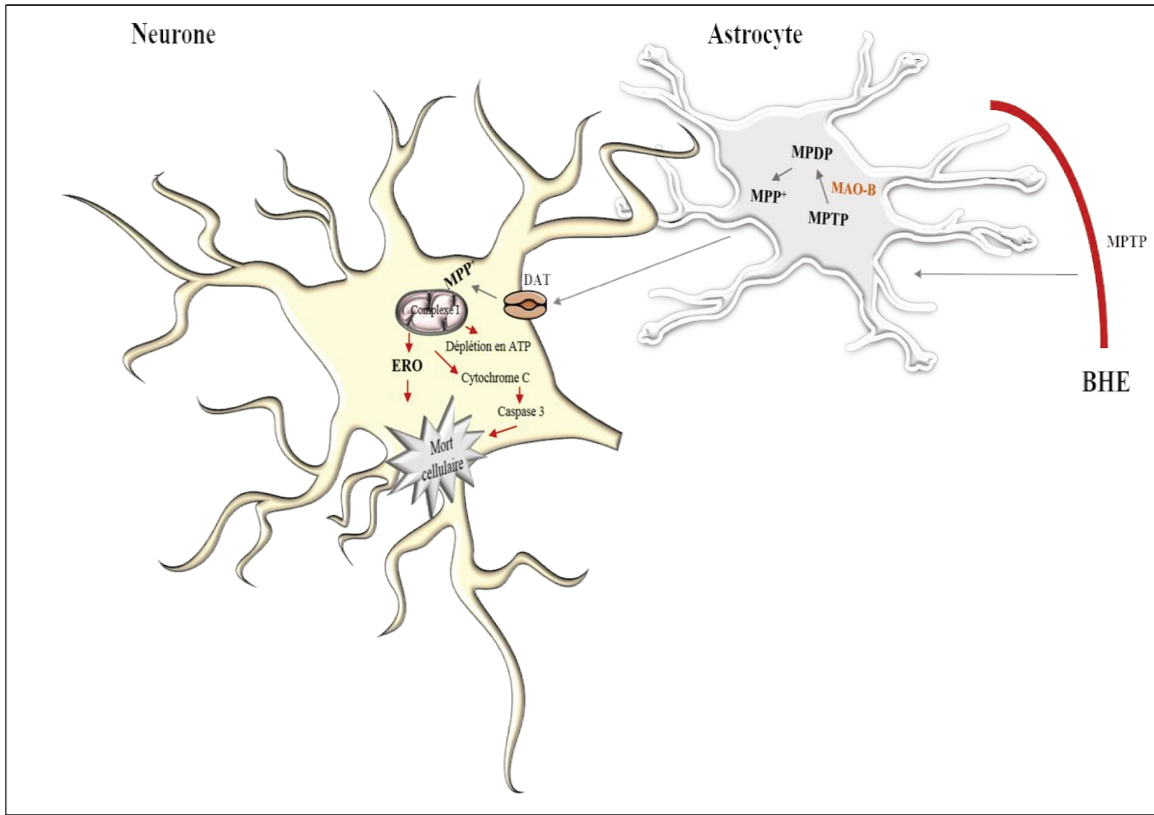


Figure 3. Schéma simplifié du mécanisme intracellulaire impliqué dans la neurotoxicité du MPTP.

BHE : barrière hémato-encéphalique, MAO-B : monoamine oxydase B, DAT : transporteur de la dopamine, ERO : espèces réactives de l'oxygène.

1.6. Désordre neuronal et mort cellulaire au cours de la MP

1.6.1. Stress oxydatif

1.6.1.1. Définition

Dans des conditions physiologiques normales, l'organisme produit en permanence des molécules oxydantes correspondant le plus souvent à des molécules hautement réactives dérivées de l'oxygène sous forme de radicaux libres primaires $O_2^{\cdot-}$ (radical superoxyde), de H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène) et de $\cdot OH$ (radical hydroxyle ; Gebicki, 2016, Pham-Huy et al., 2008). Les systèmes de défense chargés d'éliminer ces dérivés sont constitués d'enzymes naturellement présentes dans les cellules telles que la superoxyde dismutase (SOD ; Rahal et al., 2014), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx ; Pham-Huy et al., 2008). De ce fait, en conditions physiologiques basales, peu de

ERO parviennent à oxyder les constituants cellulaires, ce qui permet de préserver l'intégrité de la cellule (Birben et al., 2012, Sies, 1997).

1.6.1.2. Conséquences du stress oxydatif

Dans certaines conditions (tabagisme, exposition à des polluants chimiques, radiations solaires, etc.), la production des radicaux libres primaires devient excessive et la cellule ne parvient plus à les éliminer. L'accumulation de ces derniers provoque l'oxydation de diverses macromolécules telles que des protéines, des lipides et l'ADN. Les sous-produits générés sont responsables de la formation de radicaux libres secondaires (ROO⁻ ; Finkel et al., 2000, McCord, 2000). Quand leur production devient excessive à l'intérieur de la cellule, elle provoque l'inactivation des systèmes enzymatiques, la dégradation des protéines, l'altération de l'ADN et la détérioration de la membrane cellulaire. L'ensemble de ces agressions biochimiques peut induire la destruction des cellules par nécrose et/ou par apoptose (Day et al., 2006).

Au niveau de l'organisme, le stress oxydant est une des causes dominantes du vieillissement (Friguet, 2006, Mariani et al., 2005, Voss et al., 2006). Celui-ci est également impliqué dans diverses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires (Dhalla et al., 2000, Touyz, 2004) et les cancers (Sosa et al., 2013). Le stress oxydatif peut aussi contribuer au développement de certaines maladies neurodégénératives (Despor, 2005) telles que la MA (Perry et al., 2002, Tramutola et al., 2016) et la MP (Dias et al., 2013, Martignoni et al., 1999, Sharma et al., 2015).

1.6.1.3. Stress oxydatif, dysfonctionnement mitochondrial et MP

L'implication du stress oxydatif et du dysfonctionnement mitochondrial dans la pathogénie de la MP a été proposée par plusieurs auteurs (Bhattacharjee et al., 2016, Hu et al., 2016, Hwang, 2013). En effet, cette pathologie serait liée à une déficience systémique de l'activité de la chaîne respiratoire qui est à l'origine de l'apparition du stress oxydatif (Bhat et al., 2015, Fukae et al., 2007, Lin et al., 2006, Parker et al., 1998). En d'autres termes, les mitochondries se comportent comme des « centrales électriques » afin de produire l'énergie nécessaire au bon fonctionnement des neurones (Bhat et al., 2015, Orii et al., 1996). Néanmoins, si le complexe I est altéré, il laisse fuir des électrons qui induisent la production des ERO. La génération de radicaux hydroxyles et

superoxydes au cours de la production d'ATP, constitue un élément majeur dans la naissance d'un dommage oxydant menaçant l'ADN mitochondrial (ADNmt) ainsi que le reste des composants de la mitochondrie. Si l'ADNmt est endommagé, l'expression des protéines mitochondriales et les fonctions de nombreuses enzymes métaboliques impliquées dans la chaîne de transport des électrons sont affectées, ce qui crée un cercle vicieux de production des ERO à l'intérieur de la mitochondrie et répand le stress oxydatif dans toute la cellule (Bhat et al., 2015, Islam, 2017). Divers facteurs peuvent être à l'origine de l'altération de la mitochondrie, comme des mutations spontanées touchant les protéines mitochondriales, des agents toxiques, la DA, etc.

Une étude a mis en évidence, la présence d'ADNmt mutant (délétion de 4 977 pb) au niveau du striatum de patients parkinsoniens et cette mutation pourrait contribuer aux processus physiopathologiques de la MP (Ikebe et al., 1990). De même, des patients atteints de la forme familiale causée par la mutation du gène Parkin, ont montré une diminution de l'activité du complexe I (Muftuoglu et al., 2004). D'autres parkinsoniens issus de la forme sporadique causée par une mutation touchant le gène PINK1 ont présenté une altération de l'activité mitochondriale (Valente et al., 2004). De plus, plusieurs modèles in vitro et in vivo reproduisant ces mutations ont confirmé l'association de celles-ci avec l'altération de la chaîne respiratoire au cours de la MP (Blesa et al., 2012, Dehay et al., 2011, Heo et al., 2012). Enfin, des travaux antérieurs démontrant que l'activité du complexe I est amoindrie chez les parkinsoniens sont venus renforcer l'hypothèse de l'implication du dysfonctionnement mitochondrial au cours de cette pathologie (Janetzky et al., 1994, Parker et al., 1989, Schapira et al., 1990).

Par ailleurs, la découverte de la toxicité mitochondriale du MPP⁺ a joué un rôle crucial dans la compréhension des mécanismes délétères mis en place dans le développement de la MP (Betarbet et al., 2002, Davis et al., 1979, Duty et al., 2011). D'autres agents toxiques comme des pesticides (roténone, paraquat, etc.) ont aussi contribué à élucider les mécanismes responsables de l'altération mitochondriale dans cette pathologie. En effet, l'administration intrapéritonéale de MPTP (souris) ou de roténone (rat) entraîne une perte sélective des neurones dopaminergiques de la SN, et

ce, en inhibant spécifiquement le complexe I de la mitochondrie, ce qui génère des ERO et induit la mort neuronale (Betarbet et al., 2002, Betarbet et al., 2000).

Par ailleurs, la DA elle-même constitue une source de radicaux libres (Hastings, 2009, Juarez Olguin et al., 2016, Nachtman et al., 1987). En effet, si le stockage de celle-ci est perturbé et que les niveaux de ce neurotransmetteur augmentent dans le cytoplasme, la DA s'oxyde et génère par des mécanismes enzymatiques et non enzymatiques des composés réactifs tels que l'acide dihydroxyphénylacétique (DOPAC), des composés quinoniques et des radicaux libres qui sont nocifs vis-à-vis des neurones dopaminergiques et accroissent leur vulnérabilité au stress oxydatif (Hastings, 2009, Jana et al., 2011, LaVoie et al., 1999, B. T. Zhu, 2004). Le fer serait aussi à l'origine des ERO au sein des neurones dopaminergiques (Jiang et al., 2013). En effet, ce dernier catalyse la réaction de Fenton, laquelle produit considérablement de radicaux hydroxyles qui s'attaquent aux différentes composantes de la cellule (Hastings, 2009, Hwang, 2013, Thomas et al., 2009).

Au final, plusieurs travaux réalisés en postmortem sur des cerveaux de patients parkinsoniens sont venus renforcer l'hypothèse de l'implication du dysfonctionnement mitochondrial et du stress oxydatif dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques. Ces travaux ont mis en évidence la présence de sous-produits de l'oxydation de l'ADN et de l'ARN, de la peroxydation lipidique ainsi que l'augmentation de protéines carbonylées (Dias et al., 2013, Jenner et al., 1992, Lin et al., 2006).

1.6.2. Processus excitotoxique et implication dans la MP

L'excitotoxicité est, comme l'indique son nom, une toxicité induite par la stimulation excessive des récepteurs glutamatergiques par le glutamate ou tout autre agent excitotoxique, qui met en place l'activation d'une cascade de processus nocifs conduisant à la destruction du neurone (Ambrosi et al., 2014). Ce processus pathologique est commun à diverses atteintes neurologiques telles que les accidents vasculaires cérébraux (AVC ; Lai et al., 2014) et les maladies neurodégénératives (Caudle et al., 2009). Divers dérèglements cellulaires peuvent être à l'origine de l'excitotoxicité. Si le système glutamatergique est touché, avec par exemple une altération des systèmes de recapture et/ou de recyclage, un niveau élevé de glutamate sera présent dans la fente

synaptique, provoquant une stimulation accrue des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) responsables du mécanisme d'excitotoxicité (Sattler et al., 2001). Le métabolisme du tryptophane (Trp) peut aussi contribuer au déclenchement de ce processus, et ce, par l'hyperstimulation des récepteurs NMDA induite par l'acide quinoléique, un métabolite de la voie de la kinurénine (métabolite de Trp ; Lugo-Huitron et al., 2013). En outre, l'altération de l'activité mitochondriale peut également être à l'origine d'une excitotoxicité indirecte qui ne résulterait pas d'une présence excessive de glutamate (Nicholls, 2004). En effet, à l'état basal, les neurones maintiennent un potentiel de repos aux alentours de 65 mV. Celui-ci est contrôlé par une pompe sodium-potassium consommatrice d'énergie (Na⁺-K⁺ ATPase). En cas d'atteinte mitochondriale, la production d'énergie est amoindrie et le neurone ne peut maintenir ce potentiel, ce qui induit une dépolarisation de la membrane. Il y a en conséquence une entrée massive de calcium (Ca²⁺) par les canaux calciques voltage-dépendants ainsi que par les récepteurs NMDA et il s'ensuit la destruction de la cellule.

Plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle l'excitotoxicité pourrait être impliquée dans la pathogénie de la MP (Ambrosi et al., 2014, Beal, 1998, Blandini, 2010). En effet, l'existence de différents facteurs pouvant altérer les mitochondries affecte les neurones et les rend vulnérables au glutamate (Blandini, 2010). En particulier, comme mentionné précédemment, des études ont montré que l'inhibition du complexe I de la mitochondrie par différents agents neurotoxiques tels que le MPTP provoque la mort cellulaire par excitotoxicité et que cette dernière est prévenue par l'utilisation d'antagonistes des récepteurs NMDA (Brouillet et al., 1993). De même, des travaux antérieurs ont montré que des agrégats d' α -synucléine sont responsables d'amplifier des transmissions pré et postsynaptiques glutamatergiques, ce qui conduit à la mort cellulaire par excitotoxicité (Price et al., 2010). Enfin, en tenant compte du rôle crucial que joue la neuro-inflammation dans la physiopathologie de la MP, il a été rapporté qu'elle contribuerait à l'excitotoxicité au cours de la MP (Viviani et al., 2014). En effet, ce processus provoque la libération du glutamate et potentialise les réponses médiées par les récepteurs glutamatergiques par le biais du TNF- α , ce qui promeut l'excitotoxicité (Ambrosi et al., 2014, Olmos et al., 2014). Mutuellement, grâce à l'existence des deux types de récepteurs glutamatergiques à la surface des cellules microgliales, le glutamate

est capable de promouvoir la libération des cytokines pro-inflammatoires, mettant ainsi en place la cascade neuro-inflammatoire (Domercq et al., 2013, Olmos et al., 2014, Taylor et al., 2005). Ces mécanismes réciproquement induits s'appuient donc sur un diallèle ayant pour conséquence la dégénérescence de la voie nigrostriée, ce qui contribue à l'évolution de la maladie (Ambrosi et al., 2014).

En tenant compte des prémices de l'excitotoxicité, une cascade commune d'évènements cellulaires est déclenchée. La mort neuronale associée à ce phénomène serait due à des perturbations ioniques, à des activations enzymatiques excessives et à un stress oxydatif exacerbé (Choi, 1988, Hugon et al., 1996, Olney, 1990). En effet, le dysfonctionnement de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ [NCX] (Bano et al., 2005) et l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants causés par la dépolarisation de la cellule sont à l'origine d'une entrée massive de Ca^{2+} . Celui-ci entraîne l'activation de systèmes enzymatiques dont, entre autres, des lipases, des endonucléases et des protéases (Dong et al., 2009), qui dégradent les structures cellulaires. Par exemple, les calpaïnes (cystéine-protéases) ont pour fonction de fragiliser la membrane lysosomale pour permettre la libération de cathepsines (aspartylprotéases lysosomales) responsables de la dégradation des protéines du cytosquelette, ce qui conduit à la nécrose (Artal-Sanz et al., 2005, Syntichaki et al., 2002). L'apoptose prend aussi place dans ce champ de bataille où l'augmentation considérable du Ca^{2+} intracellulaire engendre un dérèglement de la mitochondrie, ce qui fragilise la membrane, laissant fuir des radicaux libres et le cytochrome c. Ces derniers conduisent la cellule au suicide (Rego et al., 2003). Aussi, l'élévation du Ca^{2+} intracellulaire favorise la production du monoxyde d'azote (NO) par les cellules gliales et induit l'activation des facteurs de transcription qui accroissent l'expression des cytokines pro-inflammatoires, ce qui promeut la neuro-inflammation impliquée en partie dans la neurodégénérescence (Beal, 1998, Furman et al., 2014, Yuste et al., 2015).

1.6.3. Neuro-inflammation liée à la MP

Au niveau du cerveau, les cellules gliales (microglies, astrocytes, etc.) jouent un rôle cardinal dans la régulation de l'homéostasie de l'environnement neuronal. Étant les macrophages du SNC, la microglie assure le maintien du système immunitaire cérébral,

et ce, en sécrétant de nombreuses molécules pro- ou anti-inflammatoires tels des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance et des radicaux libres (Q. Wang et al., 2015). Ces molécules peuvent être à l'origine d'une action anti-inflammatoire (neuroprotectrice, proliférative, etc.) en participant à la cicatrisation des lésions cérébrales, ou pro-inflammatoire en mettant en place une cascade d'évènements délétères qui potentialisent les dommages oxydants et engendrent la perte neuronale (Tansey et al., 2010). Plusieurs facteurs dont le stress oxydatif et le dysfonctionnement mitochondrial peuvent être à l'origine d'un équilibre précaire entre médiateurs inflammatoires (cellulaires et moléculaires) promouvant l'installation de la neuro-inflammation d'une manière chronique, ce qui a pour conséquence la progression de la mort neuronale.

1.6.3.1. La microglie agit comme médiateur cellulaire du processus neuro-inflammatoire

En tenant compte des conditions physiologiques environnantes, la microglie peut présenter une diversité phénotypique lui permettant d'être propice (phénotype alternatif M2) ou délétère (phénotype M1) à la réparation tissulaire selon le stade de la lésion (Orihuela et al., 2016). Le phénotype M2 serait majoritairement présent dans les phases précoces du processus dégénératif où il prévient les dommages dégénératifs en sécrétant diverses molécules anti-inflammatoires qui réparent le tissu lésé et neutralisent les cellules à phénotype pro-inflammatoire, telles que les IL-4, IL-10, IL-13, et le transforming growth factor beta (TGF- β ; Herrera et al., 2015, Orihuela et al., 2016, Y. Tang et al., 2014, Q. Wang et al., 2015). Il apparaît que la suppression de l'histone H3K27me3 demethylase Jumonji domain containing 3 (Jmjd3), responsable de la polarisation de la microglie M2, abolisse l'activation de la microglie réparatrice et potentialise les réponses pro-inflammatoires médiées par le phénotype M1, avec pour conséquence la destruction accrue des neurones dopaminergiques de la SN (Y. Tang et al., 2014). En général, avec l'avancement du processus dégénératif, une régulation à la baisse des gènes impliqués dans la polarisation de la microglie M2 a lieu, ce qui augmente la proportion de cellules de type M1 (Moehle et al., 2015, Pisanu et al., 2014). De ce fait, l'activité microgliale devient délétère.

Chez les parkinsoniens, des analyses anatomiques et biochimiques effectuées en postmortem, ont révélé la présence d'une activation excessive de la microglie contribuant au développement de la maladie (Bartels et al., 2010, Nagatsu et al., 2007, Sanchez-Guajardo et al., 2013). La tomographie par émission de positons, réalisée sur différents patients souffrant de la MP, a également révélé la présence d'une forte activation microgliale dans différentes régions du cerveau tels le striatum et la SN (Gerhard et al., 2006). De même, des travaux ont aussi mis en évidence une intense production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et l'interféron gamma (IFN- γ) au niveau des GB (Nagatsu et al., 2000a, Nagatsu et al., 2000b). Ces données corroborent les résultats d'une étude récente effectuée sur 62 patients atteints de la MP, montrant une forte production de ces mêmes cytokines au niveau plasmatique (X. M. Wang et al., 2016c). Ces résultats viennent renforcer l'hypothèse de l'implication de l'immunité périphérique et cérébrale dans la pathogénie de la MP.

Plusieurs modèles reproduisant la MP in vivo ont permis de consolider ces données et ont également mis en évidence la présence de marqueurs caractérisant la mort neuronale au site d'inflammation (Cicchetti et al., 2002, Sy et al., 2010, F. Zhou et al., 2007). Parmi ces marqueurs, nous retrouvons l' α -synucléine, l'ATP et la métalloprotéase matricielle 3 (MMP3). Étant libérés par les neurones dopaminergiques dégénérés, ceux-ci créent un cercle vicieux de dégénérescence neuronale permanente et progressive (Q. Wang et al., 2015). En outre, la microglie et les neurones sont des cellules intimement liées vu leurs interactions. Dans les conditions physiologiques basales, les neurones sécrètent des immunomodulateurs tels que la fractalkine (CX3CL1), le cluster of differentiation 200 (CD200) et le CD95 afin de maintenir l'état de repos de la microglie. Inversement, celle-ci exerce un rétrocontrôle positif sur la production des immunomodulateurs stimulant l'expression de leurs récepteurs. Toutefois, si la voie de signalisation de ces effecteurs est altérée, cela peut être préjudiciable aux neurones. Notamment, des études réalisées sur des rongeurs ont révélé qu'une déficience en ligands ou récepteurs pour CX3CL1 ou CD200 engendre non seulement une microgliose mais aussi un accroissement de la neurotoxicité (Pabon et al., 2011, S. Zhang et al., 2011).

1.6.3.2. Les astrocytes comme médiateurs cellulaires de la neuro-inflammation

Il a été démontré que les astrocytes jouent un rôle crucial dans le processus neuro-inflammatoire (Rappold et al., 2010). Certains chercheurs ont suggéré que ces cellules pouvaient être dotées d'une action anti-inflammatoire neuroprotectrice au cours des maladies neurodégénératives (Colangelo et al., 2014, Ishida et al., 2006). En revanche, diverses études ont mis en évidence une action pro-inflammatoire (Carson et al., 2006, More et al., 2013) et délétère vis-à-vis des neurones dopaminergiques (Rappold et al., 2010). En effet, des travaux ont souligné la présence de certains marqueurs d'astrocytes réactifs tels que la vimentine, le glial-derived neurotrophic factor (GDNF) et le glial fibrillary acidic protein (GFAP), chez des patients souffrant de la MP et des modèles reproduisant la pathologie in vivo (Damier et al., 1993, El Massri et al., 2016, Forno et al., 1992, Tong et al., 2015, Wachter et al., 2010, Q. Wang et al., 2015, D. C. Wu et al., 2002).

En outre, il a également été montré que les astrocytes peuvent agir en synergie avec la microglie pour amplifier la réponse pro-inflammatoire (Saijo et al., 2009). Notamment, la réduction de l'expression du récepteur nucléaire Nurr1, impliqué dans le maintien des neurones dopaminergiques, provoque une réponse inflammatoire excessive dans un modèle de coculture de cellules microgliales et d'astrocytes. La réponse inflammatoire a été amplifiée sous l'action de substances pro-inflammatoires et cytotoxiques libérées par les astrocytes et qui ont pour cible la microglie (Saijo et al., 2009).

Par ailleurs, au cours de la MP, les astrocytes peuvent être stimulés par plusieurs médiateurs inflammatoires tels que certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et TNF- α). Ils peuvent également être stimulés par les agrégats d' α -synucléine abondamment présents au cours de cette pathologie. Lors d'une première stimulation de la réponse inflammatoire, les astrocytes sécrètent différentes molécules à action réparatrice. Cependant, avec l'avancée du processus dégénératif, la libération des médiateurs pro-inflammatoires et des molécules cytotoxiques (ERO, NO, etc.) devient prépondérante, ce qui va modifier la réponse neuro-inflammatoire et promouvoir la mort neuronale (Damier et al., 1993).

1.6.3.3. Implication de certains gènes associés à la MP dans la neuro-inflammation

Certaines données suggèrent que plusieurs gènes sont associés à la MP. Ils codent par exemple pour l' α -synucléine, la LRRK2, la Parkin, la PINK1 ou la DJ-1, soit des molécules qui participeraient à la réponse neuro-inflammatoire médiée par les cellules gliales. En particulier, au niveau de la SN, des oligomères issus de formes anormales de l' α -synucléine seraient capables de déclencher une microgliose via le récepteur de reconnaissance toll-like receptor 2 (TLR2 ; Codolo et al., 2013, Watson et al., 2012). De même, des études effectuées in vitro et in vivo ont démontré que la répression du gène LRRK2 abolit la production de TNF- α et de l'oxyde nitrique synthase (forme inductible) (iNOS) libérés en présence de lipopolysaccharides (LPS), et prévient l'activation du facteur de transcription NF- κ B (B. Kim et al., 2012, Moehle et al., 2012).

Par ailleurs, il a été montré que le gène Parkin remplit un rôle important dans la régulation du processus neuro-inflammatoire au cours de la MP. Notamment, des souris d'un âge avancé et invalidées pour le gène Parkin présentent une activation accrue des cellules gliales au niveau du striatum et du mésencéphale (Rodriguez-Navarro et al., 2007). Une autre étude indique qu'en présence de LPS, des microglies invalidées pour le même gène montrent une production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6) beaucoup plus élevée que des microglies de phénotype sauvage (Frank-Cannon et al., 2008). De plus, une coculture de celles-ci en présence de neurones intacts provoque une neurotoxicité exacerbée face à un traitement à la roténone (Casarejos et al., 2006). En somme, ces données soulèvent l'importance que possèdent ces gènes dans la régulation de la réponse neuro-inflammatoire associée à la MP. Donc, en tenant compte du rôle crucial que jouent les cellules gliales et certains gènes associés à la MP dans le développement et la progression de la neuro-inflammation, l'intervention du système immunitaire périphérique est requise puisqu'il fait partie intégrante du maintien de la neuro-inflammation au cours de la MP.

1.6.3.4. Neuro-inflammation médiée par les cellules du système immunitaire périphérique

Avec l'évolution du processus dégénératif, l'exacerbation de la réponse immunitaire cérébrale et la profusion des médiateurs inflammatoires et cytotoxiques altèrent la BHE, ce qui conduit le cerveau à perdre son « privilège immun » (Hirsch et al., 2009, More et al., 2013). En effet, au cours de la MP, il a été démontré que l'excès de gliose libère maintes cytokines et chimiokines qui induisent alors fortement la production de molécules d'adhésion cellulaire telles que l'intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1 ; H. Neumann et al., 1998). Ces molécules augmentent la perméabilité de la BHE et attirent les cellules immunitaires périphériques qui s'infiltrent ensuite dans le cerveau (Mosley et al., 2012). Ces cellules, incluant les lymphocytes T, sont indispensables au maintien de la neuro-inflammation associée à la MP, puisqu'elles promeuvent considérablement la neurodégénérescence dopaminergique et participent ainsi à l'évolution de la pathologie (Erickson et al., 2012, Orr et al., 2002, Sil et al., 2016).

Ces données ont été largement corroborées par diverses études effectuées en postmortem et par des modèles reproduisant la MP in vivo (Depboylu et al., 2012, Miklossy et al., 2006, More et al., 2013, Mosley et al., 2012, Olson et al., 2004). Il résulte donc de ce qui précède que la neuro-inflammation occupe une place prépondérante dans la pathogénie de la MP et il s'avère que ce processus est en partie responsable de la dégénérescence des neurones dopaminergiques (Wee Yong, 2010). En fait, la neuro-inflammation serait impliquée dans plusieurs types de mort cellulaire tels que l'apoptose et la mort cellulaire autophagique (Abdul-Muneer et al., 2016, Bureau et al., 2008, Jia et al., 2006, Shao et al., 2015, J. Shi et al., 2015).

1.6.4. Morts cellulaires observées au cours de la MP

En réponse à des agressions intra et extracellulaires, la cellule peut activer divers mécanismes cellulaires pour se protéger. Si elle échoue à restaurer son homéostasie, elle provoque alors son suicide en déclenchant son apoptose, encore appelée mort cellulaire programmée (Venderova et al., 2012). En revanche, dans certaines circonstances, la cellule en réponse à une agression très forte, meurt de façon rapide et inopinée par nécrose. Dans de nombreuses pathologies neurodégénératives, nous

pouvons déceler la présence de divers types de mort cellulaire notamment, la nécroptose (nécrose programmée), l'apoptose (mort cellulaire programmée ; MCP type I) et la mort cellulaire autophagique (MCP type II ; Ghavami et al., 2014, Krantic et al., 2005, Venderova et al., 2012). Néanmoins, en se référant aux études réalisées sur la MP, on constate l'existence d'un véritable croisement entre les différents types de mort cellulaire observés dans cette pathologie (Anglade et al., 1997, Venderova et al., 2012). De même, d'autres formes de dégénérescence cellulaire caractérisant la MP ont vu le jour récemment telles que la ferroptose (MCP liée au fer) et le parthanatos (MCP liée à l'activation de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP-1 ; Do Van et al., 2016, Guiney et al., 2017, Y. Lee et al., 2014b, Venderova et al., 2012, S. W. Yu et al., 2002). Toutefois, peu de données sont disponibles pour comprendre les mécanismes empruntés par ces deux dernières. Ainsi, seules l'apoptose et l'autophagie rencontrées au cours de la MP seront abordées dans les prochains chapitres.

1.6.4.1. Mort apoptotique et MP

L'apoptose est un mécanisme évolutif par lequel la cellule programme sa propre mort. Elle s'avère indispensable à divers processus physiologiques dont le développement embryonnaire et l'homéostasie tissulaire. Néanmoins, elle joue un rôle déterminant dans plusieurs pathologies incluant le cancer et les maladies neurodégénératives (Kerr et al., 1972). En particulier, de nombreuses études ont rapporté que la dégénérescence des neurones dopaminergiques observée au cours de la MP est en majeure partie associée à un processus apoptotique (Anglade et al., 1997, Caudle et al., 2009, Lev et al., 2003, Ruberg et al., 1997a). Ainsi, sous l'action de plusieurs mécanismes physiologiques, la cellule neuronale met en place une cascade d'évènements intracellulaires qui conduisent à sa destruction.

1.6.4.1.1. Voies empruntées par l'apoptose

Des travaux menés in vitro et in vivo révèlent l'implication de plusieurs facteurs tels que les protéines agrégées (Michel et al., 2016), la neuro-inflammation (Wee Yong, 2010), le stress oxydatif (Battisti et al., 2008), le stress du réticulum endoplasmique (RE ; Concannon et al., 2008) ainsi que le dysfonctionnement mitochondrial (Yan et al., 2013) dans le déclenchement de l'apoptose. Cette dernière peut être induite soit par la voie

extrinsèque impliquant l'activation des récepteurs de mort présents à la surface cellulaire (Figure 4 ; Marsters et al., 1998) ou par la voie intrinsèque faisant intervenir la mitochondrie (Figure 4 ; D. R. Green et al., 1998). Les récepteurs de mort impliqués dans la voie extrinsèque appartiennent à la famille des récepteurs du TNF- α tels que le CD95 ou le récepteur Fas (Dhein et al., 1995), le TNF-R1 (Tartaglia et al., 1993), le TRAMP ou le DR3 (E. C. Wang et al., 2001) et les TRAIL-RI et II (MacFarlane et al., 1997). Ces récepteurs comportent un domaine cytoplasmique qui intègre le signal de mort de la surface cellulaire et le traduit sous forme de cascade de signalisation intracellulaire. L'association des ligands tels que Fas, TNF- α et TRAIL avec leur récepteur respectif amorce la trimérisation de ce dernier et provoque le recrutement des procaspases initiatrices telles que la procaspase-8 (Figure 4). Sous sa forme active la caspase-8 déclenche l'activation des autres caspases effectrices, notamment les caspases-3 et -7, qui à leur tour coordonnent leur activité afin de détruire les protéines structurales et ainsi provoquer la mort neuronale (McIlwain et al., 2015).

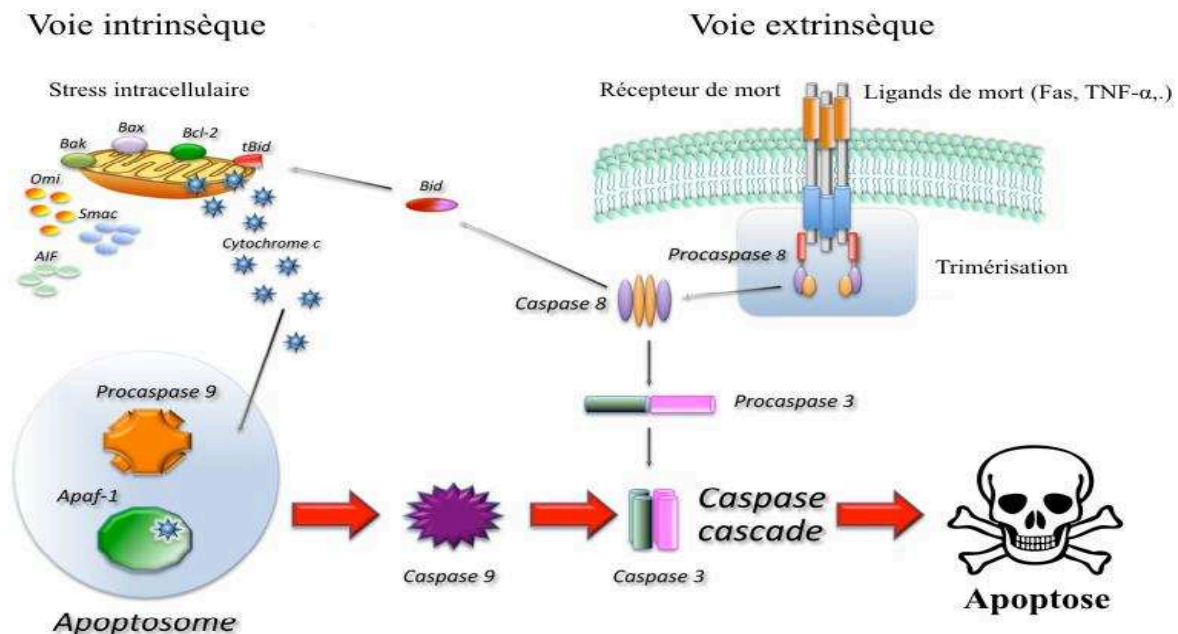


Figure 4. Représentation schématique des principales voies menant à l'apoptose.

La voie extrinsèque est traduite par l'activation des récepteurs de mort spécifiques aux ligands de mort (FAS, TNF- α , etc.) et au recrutement des procaspases-8 et à leur activation. La voie intrinsèque implique le relargage du cytochrome c par la mitochondrie, la formation de l'apoptosome et l'activation des caspases-9. Ces caspases en association avec les caspases-8 activent en aval les caspases effectrices telles que les caspases-3 qui provoque la mort cellulaire. Modifiée d'après Favaloro et al., 2012.

Contrairement à la voie extrinsèque, la voie intrinsèque apoptotique est induite par divers stimuli internes générés notamment par les radicaux libres, l'augmentation des niveaux intracellulaires de Ca^{2+} et/ou des lésions de l'ADN. Ces signaux altèrent à leur tour l'intégrité et les fonctions mitochondriales. En effet, le complexe I est altéré dans des conditions de stress cellulaire ou physiopathologiques comme la MP, ce qui conduit au découplage de l'oxydation phosphorylante et engendre une perturbation du potentiel membranaire mitochondrial. À cet effet, le facteur de transcription p53 est activé pour permettre l'induction des gènes proapoptotiques dont le p53, l'actin-interacting protein (AIP-1 ; Oda et al., 2000) et le Bax (Miyashita et al., 1995).

La protéine Bax fait partie de la grande famille des protéines Bcl-2, laquelle joue un rôle primordial dans la régulation de l'apoptose, et ce, en agissant sur la perméabilité de la membrane mitochondriale externe (Shamas-Din et al., 2013). Cette famille est caractérisée par un domaine d'homologie avec la protéine B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), appelé également BH, qui désigne les régions conservées entre les membres de cette famille. Celle-ci se divise en trois sous-familles : (i) la sous-famille des protéines antiapoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-xL, qui interagit avec les protéines proapoptotiques responsables de la formation des pores au niveau de la mitochondrie et qui ainsi empêchent le relargage de médiateurs apoptotiques ; (ii) la sous-famille des protéines proapoptotiques responsables de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe telles que Bax, Bak et Bok ; et enfin (iii) la sous-famille des protéines proapoptotiques dites « à BH3 seulement » qui compte actuellement une dizaine de membres (Bad, Bim, Noxa, Puma, etc.) pouvant interagir de façon directe ou indirecte avec les deux autres sous-familles.

Par ailleurs, comme mentionné ci-dessus, quand le gène Bax est induit, une augmentation intracellulaire du ratio des protéines proapoptotiques par rapport à celles antiapoptotiques (Basu et al., 1998, Korsmeyer et al., 1993) est notée en cas d'agressions cellulaires. De fait, Bax est alors transloquée vers la mitochondrie, provoquant l'augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe et le relargage de facteurs apoptogènes tels que le cytochrome c, l'apoptosis inducing factor (AIF), l'endonucléase G, la second mitochondria-derived activator of caspases

(Smac)/Diablo et la Htr2A/Omi. Le déclenchement de la cascade d'activation des caspases est initié par la formation de l'apoptosome, et ce, par l'association du cytochrome c avec l'apoptotic peptidase activating factor-1 (APAF-1) et la procaspase-9, tous deux présents dans le cytosol. Une fois formé, il active à son tour les caspases effectrices qui seront responsables de l'inhibition des enzymes réparatrices, du clivage des protéines de structure et des caspase activated DNases (CAD) qui, à leur tour, initient la fragmentation de l'ADN (H. Y. Chang et al., 2000, McIlwain et al., 2015).

En parallèle, Smac/Diablo et Omi/HtrA2 vont activer davantage les caspases exécutrices en antagonisant les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs) présentes dans le cytosol, favorisant ainsi l'apoptose (Ekert et al., 2001). De même, la condensation nucléaire et la fragmentation de la chromatine prennent place sous l'action de l'AIF et de l'endonucléase G.

1.6.4.1.2. Marqueurs apoptotiques présents au niveau de la SN

De nombreuses études ont démontré que la perte des neurones dopaminergiques au cours de la MP est induite en partie par apoptose (Anglade et al., 1997, Lev et al., 2003, Mochizuki et al., 1996, Venderova et al., 2012). De même, des travaux menés par plusieurs équipes ont relevé la présence de marqueurs proapoptotiques qui témoignent de l'implication de l'apoptose dans la dégénérescence de ces mêmes neurones. En effet, l'analyse postmortem de tissus de patients atteints de la MP a révélé une forte expression de p53 et de CD95 par rapport aux individus sains (de la Monte et al., 1998). L'expression de p53 est médiée et est stabilisée par la p38 phosphorylée, un membre de la voie MAPK, dont son augmentation a été également mise en évidence au niveau de la SN de patients parkinsoniens (Da Costa et al., 2011). De même, quant à l'expression de CD95, celle-ci est sous le contrôle des lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺ (Bas et al., 2001). À ce titre, il a été rapporté que quand ces lymphocytes sont activés, ils régulent à la hausse l'expression de CD95, laquelle occupe une place prépondérante dans la régulation de la mort cellulaire (Phelouzat et al., 1997).

En outre, des études d'immunobuvardage effectuées en postmortem ont également montré la présence des formes actives des enzymes catalytiques telles les caspases-3 et -8 au niveau de la SN. Les niveaux d'activation de celles-ci se sont avérés beaucoup

plus élevés au niveau des cerveaux de patients parkinsoniens que dans ceux issus de patients contrôles (Hartmann et al., 2000, Hartmann et al., 2001, Mogi et al., 2000).

De plus, plusieurs études sont venues renforcer l'hypothèse de l'implication des cytokines pro-inflammatoires dans l'activation du processus apoptotique qui caractérise la dégénérescence des neurones dopaminergiques (Nagatsu, 2002, Nagatsu et al., 2000a). Nagatsu et coll. ainsi que d'autres équipes ont mis en évidence une augmentation d'interleukines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-1 β ainsi que le TNF- α et son récepteur TNF-R1 au niveau des régions nigrostriatales chez des patients parkinsoniens (Mogi et al., 1994, Nagatsu et al., 2000a, Nagatsu et al., 2000b). Ils ont également relevé une diminution significative des niveaux de neurotrophines telles que le brain-derived neurotrophic factor (BDNF) et le nerve growth factor (NGF) dans les mêmes régions (Nagatsu et al., 2000a). Ceci souligne le rôle prépondérant que jouent ces facteurs dans la survie neuronale (Mogi et al., 1999, Nagatsu, 2002).

Par ailleurs, les groupes de Nagatsu, de Halliwell et de Hirsch ont également relevé une expression significative des ARNm de Bcl-2 et Bcl-xL au niveau des ganglions de la base et plus spécifiquement au niveau de la SN de patients parkinsoniens (Hartmann et al., 2002, Marshall et al., 1997, Mogi et al., 1996). Les auteurs ont suggéré que l'expression élevée des ARNm des protéines antiapoptotiques au niveau de la SN, pouvait être un événement précoce vis-à-vis des processus physiopathologiques caractérisant la MP, tel le stress oxydatif, et que cette région du cerveau subit probablement un stress qui se manifeste sur plusieurs années avant l'apparition des premiers symptômes de la maladie.

Dans le même contexte, plusieurs modèles in vitro et in vivo sont venus renforcer les données obtenues en postmortem à partir de patients souffrant de la MP (Barnum et al., 2014, Bernstein et al., 2013, Kavanagh et al., 2015, J. Pan et al., 2007, Turmel et al., 2001). En particulier, le MPTP ainsi que son métabolite actif le MPP⁺ constituent tous deux des substances neurotoxiques efficaces pour étudier la MP puisqu'elles reproduisent de manière relativement fidèle des caractéristiques biochimiques, histochimiques et morphologiques du processus apoptotique observé au cours de la MP (Perier et al., 2012). De plus, ces mêmes substances sont en mesure d'activer le

processus autophagique observé au cours de la pathologie (H. Wang et al., 2016b, Y. Zhang et al., 2017).

1.6.4.2. Autophagie

1.6.4.2.1. Définition générale

Le processus autophagique est un ensemble de mécanismes métaboliques qui aboutissent à la dégradation d'une partie du contenu cytoplasmique de la cellule par ses propres lysosomes (Kaur et al., 2015). Celui-ci occupe un rôle primordial dans le contrôle de l'homéostasie intracellulaire et dans plusieurs processus physiologiques tels que le développement et la différenciation cellulaires (Kraft et al., 2009). Bien que l'autophagie puisse intervenir dans la neuroprotection au cours des maladies neurodégénératives, celle-ci peut aussi participer à la cascade apoptotique et agir comme médiateur de mort cellulaire (Maiuri et al., 2007).

Quatre formes d'autophagie ont été identifiées à ce jour, à savoir la microautophagie, l'autophagie médiée par les protéines chaperons (CMA), la «RNautophagie» et la macroautophagie (Fujiwara et al., 2013, Z. Yang et al., 2010c), cette dernière étant majoritairement activée en cas de stress et de besoin nutritionnel. L'autophagie débute par la formation de la membrane autophagosomale qui recrute plusieurs médiateurs autophagiques et séquestre la cargaison cellulaire à dégrader. Une fois formé, l'autophagosome vient fusionner avec les endosomes et/ou les lysosomes pour éliminer le matériel cellulaire piégé. Les différentes étapes décrivant le processus autophagique sont illustrées dans la Figure 5 et elles seront abordées dans la section qui suit (Z. Yang et al., 2010c).

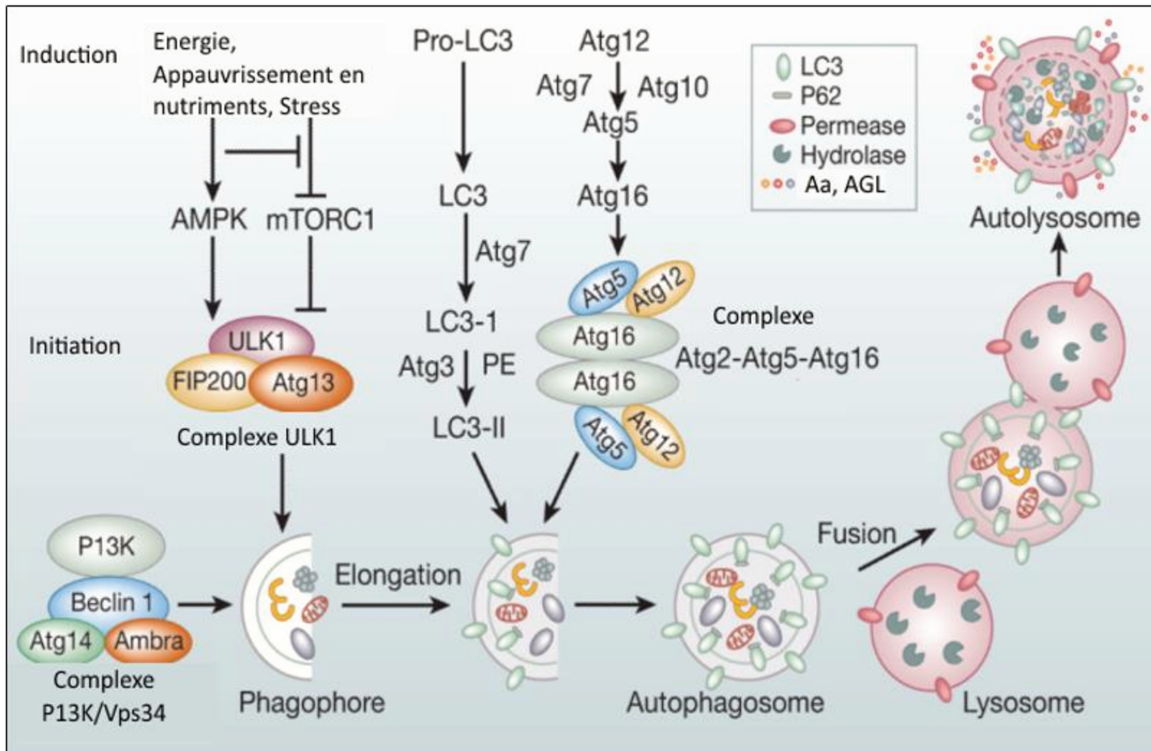


Figure 5. Les principales étapes du processus autophagique i.e. l'Induction, l'Initiation, l'Élongation, et la Maturation. Modifiée d'après Kaushal et al., 2016.

1.6.4.2.2. Déroulement du processus autophagique

Plusieurs mécanismes et acteurs moléculaires peuvent être à l'origine de la régulation et de la mise en place du processus autophagique à l'intérieur de la cellule. Parmi ces facteurs, nous citons la carence en nutriments, l'hypoxie, le stress oxydatif, etc. (N. Mizushima, 2007). Chez les mammifères, ces signaux régulent l'activité des protéines kinases mTOR (mechanistic Target of Rapamycin) auparavant connues sous le nom de mammalian Target of Rapamycin et AMPK (AMP-activated protein kinase). Ces deux voies intègrent ces signaux et coordonnent l'initiation de l'autophagie (Shang et al., 2011)

Initiation de la formation des autophagosomes

Les autophagosomes se forment à partir d'une petite membrane appelée phagophore (Figure 5). Ce dernier a fait l'objet de nombreux débats puisque différentes études ont suggéré qu'il peut provenir de plusieurs composants cellulaires dont, entre autres, la membrane plasmique, l'appareil de Golgi ou le RE (Axe et al., 2008, Tooze,

2013, Tooze et al., 2010). L'initiation de la formation des autophagosomes repose sur deux principaux complexes soit le complexe class III phosphatidylinositol 3-kinase (PI3KC3) et le complexe unc51-like kinase 1 (ULK ; Figure 5 ; Hurley et al., 2017, Wirth et al., 2013). Cette initiation nécessite tout d'abord l'activité de la kinase PI3K, connue sous le nom de vacuolar protein sorting 34 (Vps34) chez les eucaryotes. La Vps34 fait partie intégrante du complexe macromoléculaire PI3K qui est formé de Beclin 1 (Atg6), de ses protéines « partenaires » ambra-1 et UV irradiation resistance-associated gene (UVRAG), de barkor (Atg14) et de p150 (Vps15 ; Itakura et al., 2008). L'interaction de Vps34 avec la protéine Beclin 1 amplifie son activité qui est en lien avec la formation des autophagosomes. À cet effet, il a été montré que la perturbation de l'interaction de diverses protéines liant la Beclin 1 altère la formation des autophagosomes et inhibe l'autophagie (Furuya et al., 2005). En effet, l'association de Bcl-2 ou Bcl-xL avec Beclin 1 perturbe son interaction avec les autres molécules et inhibe de ce fait le processus autophagique (Pattingre et al., 2005). Néanmoins, au cours de la privation nutritionnelle, l'activation de la kinase c-Jun NH₂-terminale (JNK) provoque une phosphorylation de Bcl-2 et Bcl-XI, ce qui rompt la liaison d'avec Beclin 1 et provoque ainsi la formation des autophagosomes (Wei et al., 2008). Dans ces mêmes conditions, le second complexe ULK, formé de ULK1/2, Atg13, focal adhesion kinase family Interacting Protein of 200 kD (FIP200) et Atg101, participe à son tour à l'initiation de la formation des autophagosomes. En effet, Atg13 se lie avec la protéine ULK1 ou son homologue ULK2 et facilite leur interaction avec le FIP200 pour induire la formation des autophagosomes (Figure 5 ; Y. Y. Chang et al., 2009, Ravikumar et al., 2010). Par ailleurs, l'initiation de l'autophagie a été largement étudiée in vitro et in vivo par plusieurs équipes de recherche dans le but d'élucider les mécanismes qu'elle met en jeu. De fait, plusieurs inhibiteurs pharmacologiques des kinases PI3K ont été utilisés tels que la 3-méthyladénine (3-MA) (Caro et al., 1988) et la wortmannine (Blommaert et al., 1997). Des ARN interférents ont également été utilisés pour bloquer des protéines impliquées dans l'induction de l'autophagie dont, entre autres, la Beclin 1.

Élongation

Une fois que l'autophagie est initiée, deux réactions d'ubiquitination conduisant à l'élongation de la membrane autophagosomale se produisent au niveau du phagophore

(Figure 5). La première a lieu au niveau d'Atg12 qui se lie de manière covalente à Atg5 sous l'action d'Atg7 (E1 enzyme activant la réaction d'ubiquitination) et d'Atg10 (E2 enzyme activant la réaction d'ubiquitination ; N. Mizushima et al., 1998). Cette liaison se fait par la fixation du résidu glycine C-terminal d'Atg12 à la lysine-130 d'Atg5. Une fois liées, Atg12 et Atg5 se conjuguent avec Atg16L1 pour former le complexe Atg12-Atg5-Atg16L1 (Ravikumar et al., 2010) qui est indispensable pour l'élongation des pré-autophagosomes. La deuxième réaction d'ubiquitination concerne la protéine LC3 connue sous le nom de microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1-LC3/LC3/Atg8). Elle sert de précurseur pour la forme LC3-I. En effet, sous l'action de la protéase Atg4B (Hemelaar et al., 2003, Ravikumar et al., 2010), elle est clivée au niveau de son extrémité C-terminale pour donner l'isoforme cytosolique LC3-I. Cette dernière est ensuite conjuguée à une phosphatidyléthanolamine (PE) en faisant appel à Atg7 et Atg3 pour donner par lipidation la forme LC3-II (Tanida et al., 2004). Finalement, LC3-II s'associe à la membrane autophagosomale préformée pour achever son élongation (Kabeya et al., 2000). Bien qu'elle soit localisée au niveau de la face cytoplasmique de l'autolysosome, la LC3-II n'est qu'un marqueur de l'activation de la première phase du processus autophagique puisque celle-ci est délipidée et recyclée avant la digestion lysosomale (Gimenez-Xavier et al., 2008).

Maturation des autophagosomes et fusion

Chez les mammifères, contrairement à la levure, la formation des autophagosomes ne s'effectue pas au niveau du site d'assemblage du phagophore mais s'opère plutôt aléatoirement au niveau du cytoplasme (Meijer et al., 2004, Ravikumar et al., 2010). Les autophagosomes circulent d'une manière bidirectionnelle tout au long des microtubules soit vers le centrosome (aussi appelé centre organisateur des microtubules (MTOC)) ou en direction de la périphérie. Ce transport bidirectionnel est sous l'action de deux complexes protéiques moteurs : la dynéine et la kinésine. Si les microtubules sont dépolymérisés ou si le transport de type dynéine-dépendant est inhibé, la maturation des autophagosomes sera dès lors interrompue d'où l'inhibition de l'autophagie. Une fois formé, l'autophagosome fusionnera avec les endosomes précoces puis avec ceux tardifs pour donner naissance aux amphisomes sous l'action de la machinerie protéique endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT ; Ravikumar et al., 2010).

La durée du processus de fusion de l'autophagosome avec l'endosome est très importante et doit se produire au moment où le scellage du phagophore est achevé. Si la machinerie de la fusion est recrutée et activée avant que le phagophore ne soit scellé, le matériel cellulaire séquestré sera libéré et ne sera plus dégradé (Ganley, 2013). Par la suite, sous l'action du complexe protéique soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNAREs), les amphisomes vont pouvoir fusionner avec les lysosomes pour donner naissance aux autolysosomes et déclencher la dégradation de la cargaison (Ganley, 2013). Le succès de la fusion nécessite un environnement acide maintenu par les vacuolar-type H⁺-ATPase (V-ATPases) à l'intérieur des endosomes et des lysosomes. De ce fait, plusieurs inhibiteurs tels que la bafilomycine A1 et la chloroquine ont été développés et utilisés in vitro et in vivo afin d'augmenter le pH au niveau de ces organelles et bloquer ainsi la fusion des autophagosomes/amphisomes avec les endosomes/lysosomes (Chinni et al., 1999, Mauvezin et al., 2015).

Digestion lysosomale sélective

Les autolysosomes formés renferment plusieurs organites et débris cellulaires destinés à être dégradés. Cette digestion est assurée par un ensemble d'hydrolases acides présentes à l'intérieur des lysosomes telles que les cathepsines (Dunn, 1994). Celles-ci digèrent non seulement le contenu séquestré mais aussi la membrane de l'autophagolysosome pour libérer, en cas de besoin cellulaire, des nutriments indispensables au bon fonctionnement de la cellule. Il fut longtemps considéré que la dégradation du matériel séquestré au cours de l'autophagie est un processus non sélectif jusqu'à la découverte de la protéine p62 également connue sous le nom de séquestosome 1/SQSTM1. Grâce à la présence de plusieurs domaines reconnaissant les protéines ubiquitinylées et le LC3, la P62/SQSTM1 se lie sélectivement aux protéines à dégrader et les achemine jusqu'à l'autophagosome afin qu'elles soient toutes dégradées à l'intérieur de l'autophagolysosome (Ichimura et al., 2010). Ainsi, le niveau protéique de la P62/SQSTM1 s'avère être une mesure du flux autophagique (X. J. Zhang et al., 2013).

1.6.4.2.3. Principales voies de régulation du processus autophagique

Similairement à la levure, l'initiation du processus autophagique chez les mammifères est régulée majoritairement par les voies classiques de mTOR et de AMPK. Il s'agit d'une régulation harmonisée contrôlée par la disponibilité intracellulaire des nutriments faisant intervenir la phosphorylation de ULK1/2. Néanmoins, le processus est aussi sous le contrôle d'autres voies et d'acteurs moléculaires faisant intervenir des mécanismes de régulation qui sont complètement mTOR-indépendants (Sarkar, 2013).

Voie de mTOR

La voie mTOR a la capacité d'orchestrer plusieurs voies de signalisation qui interviennent non seulement dans diverses fonctions cellulaires telles que l'initiation de la traduction, la croissance ou la prolifération cellulaire (Soliman, 2005) mais aussi dans le processus autophagique (Jung et al., 2010). Cette voie est elle-même sous le contrôle de plusieurs paramètres tels qu'un niveau élevé en acides aminés ou la présence de facteurs de croissance comme le platelet-derived growth factor (PDGF), l'insulin-like growth factor (IGF) ou l'insuline (Howell et al., 2011). Ces derniers sont connus pour activer mTOR en faisant intervenir la voie IRS/PI3K/Akt. En outre, mTOR se caractérise par deux complexes distincts (Figure 6) à savoir mTORC1 et mTORC2 qui partagent certaines composantes protéiques telles que la sous-unité catalytique mTOR, la G protein β -subunit-like protein (G β L) appelée aussi mST8, ainsi que la DEP domain-containing mTOR-interacting protein (DEPTOR). Toutefois, ils diffèrent par la présence de regulatory associated protein of mTOR (Raptor) et de proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) au niveau de mTORC1 et de rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin (Rictor) et de stress-activated protein kinase-interacting protein 1 (Sin1) au niveau de mTORC2 (H. Yang et al., 2013).

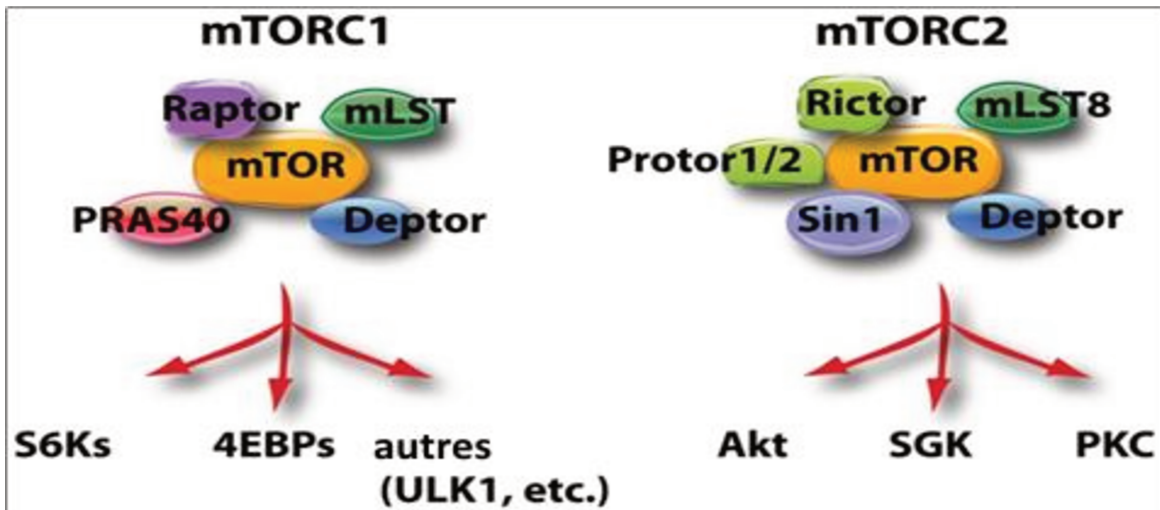


Figure 6. Schéma illustrant les éléments des deux complexes mTOR i.e. mTORC1 et mTORC2. Modifiée d'après Limon et al., 2012.

Le complexe mTORC1 est responsable de la réception et de la coordination des signaux nutritionnels et environnementaux qu'il intègre et peut être modulé par des facteurs de croissance, des acides aminés et certaines formes de stress (Sato et al., 2007). De par ses fonctions, le mTORC1 est aussi impliqué dans la régulation de l'autophagie. En effet, en présence de niveaux élevés en acides aminés et en facteurs de croissance, le mTORC1 régule négativement le processus autophagique (Sancak et al., 2008). Ce complexe, connu pour être sensible à la quantité de nutriments présents dans l'environnement cellulaire, phosphoryle à la fois la protéine Atg13 et les kinases ULK1/2, empêchant ainsi leur association et la formation du complexe stable ULK1/2-FIP200-Atg13-Atg101 (Hosokawa et al., 2009). En réponse à cette phosphorylation, le processus autophagique est ainsi inhibé à l'étape de l'expansion du phagophore. À l'inverse, dans des conditions de carence nutritive, le complexe mTORC1 est inactivé, les sites de phosphorylation se trouvant au niveau du complexe ULK1/2-FIP200-Atg13-Atg101 se déphosphorylent et les kinases ULK1 et ULK2 s'autophosphorylent pour ensuite activer Atg13 et FIP200 (Figure 7). L'inhibition de mTORC1, comme observé dans un état nutritif carencé, peut être reproduite par une exposition à la rapamycine. Cette substance de nature antibiotique s'associe avec le complexe FKBP12 pour

stabiliser l'association de la sous-unité Raptor avec celle de mTOR, causant ainsi l'inhibition de son activité kinase.

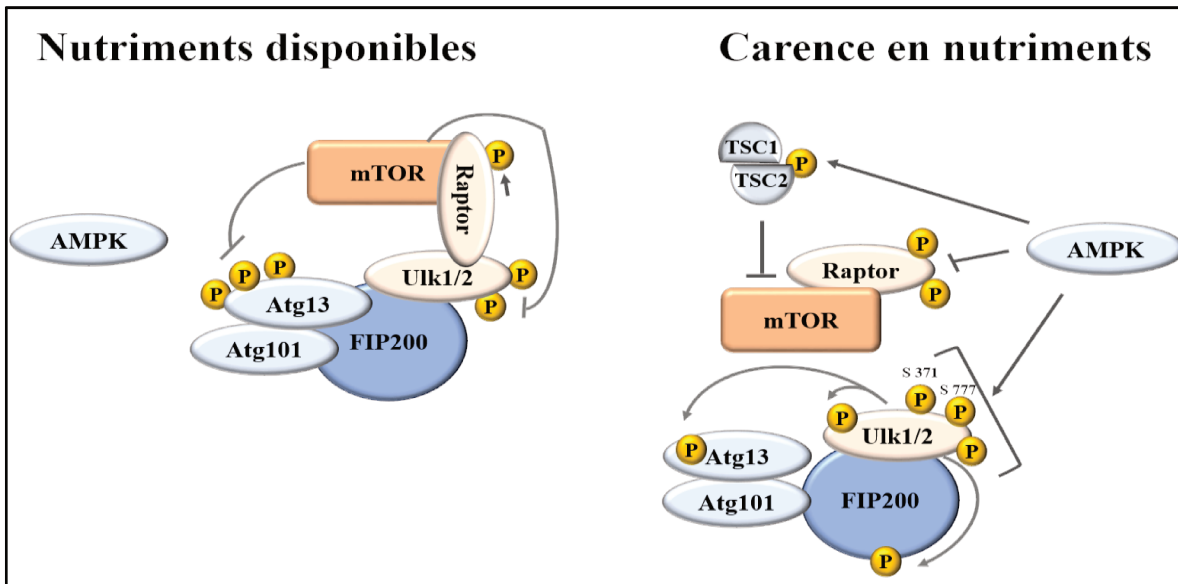


Figure 7. Signalisation en aval de mTORC1 et régulation de l'autophagie. Ulk1 et Ulk2 forment un complexe stable avec Atg13, FIP200 et Atg101.

En présence de ressources nutritionnelles, mTORC1 phosphoryle Ulk1/2 et Atg13, inhibant ainsi l'activité kinase Ulk1/2 et déstabilisant le complexe formé. En état de carence, Ulk1/2 s'autophosphoryle et phosphoryle Atg13 et FIP200, ce qui conduit à la translocation de l'ensemble du complexe au niveau de la membrane pré-autophagosomale et à l'induction de l'autophagie.

Alternativement, AMPK phosphoryle Ulk1/2 qui serait ainsi activé. En outre, AMPK conduit indirectement à l'induction de l'autophagie en inhibant mTORC1 par la phosphorylation de Raptor ou de TSC2. Modifiée d'après Tchevkina et al., 2012.

Quant au complexe mTORC2, celui-ci est également impliqué dans divers processus physiologiques tels que la régulation du cytosquelette et des activités métaboliques cellulaires, et ce, par l'activation des enzymes Akt/PKB, PKC et serum-and glucocorticoid-induced protein kinase1 (SGK1 ; Jacinto et al., 2004). L'implication de mTORC2 dans la régulation de l'autophagie n'a toutefois été que très peu exploitée. Sandri et coll. ont montré que le knockdown de la sous-unité Rictor, composante clé de mTORC2, stimule significativement la formation des autophagosomes au niveau du muscle squelettique et que cet effet est contrecarré par la forme active de Akt (Mammucari et al., 2008). Leurs travaux suggèrent que l'autophagie est sous le contrôle de la voie Akt/Forkhead box O3 (FoxO3) régulée par mTORC2. FoxO3 est un facteur de transcription connu pour sa fonction de transcription des gènes liés à l'autophagie.

Inhibé par l'activation de Akt, celui-ci serait incapable d'activer l'autophagie. En se basant sur toutes ces données, nous pouvons suggérer que le complexe 2 est impliqué en partie dans la régulation négative du processus autophagique (Jung et al., 2010).

Voie de l'AMPK

L'AMPK est une sérine thréonine kinase impliquée dans le métabolisme énergétique (Hardie et al., 2012). Ce complexe hétérotrimérique est constitué d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices β et γ . La sous-unité γ semble former un site de liaison où se lient les nucléotides responsables de la régulation de l'AMPK soit l'ATP et l'AMP mais avec des affinités distinctes. Cette kinase est connue pour être sensible aux changements de niveaux énergétiques, et précisément au ratio AMP/ATP (Viollet et al., 2011). Dans des conditions physiologiques, des molécules d'ATP occuperaient tous les sites allostériques formés par la sous-unité régulatrice γ , ce qui inhiberait l'AMPK. En revanche, dans des conditions appauvries en ATP (ratio AMP/ATP élevé) ou exhibant certaines formes de stress énergétiques (hypoxie, ischémie, carence en glucose, etc.), l'ATP auparavant disponible au niveau cellulaire serait remplacée par de l'AMP et de l'ADP. La fixation de l'AMP sur les sites de liaison auparavant occupés par l'ATP activerait l'AMPK de manière allostérique. En amont, l'AMPK est activée par les AMPK kinases liver kinase B1 (LKB1), la *transforming growth factor β activated kinase* connue sous l'acronyme TAK1, et la *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase β* (CaKK β), et ce, en phosphorylant la sous-unité α au niveau de la thréonine-172 (Q. Xu et al., 2010). Cette régulation positive active les voies cataboliques productrices d'énergie et inhibe les voies anaboliques consommatrices d'énergie. C'est à ce niveau que l'AMPK intervient dans l'activation du processus autophagique afin de permettre à la cellule de combler sa demande en énergie. Cette activation peut se faire par deux mécanismes distincts. Le premier implique l'inhibition directe de l'activité kinase de mTORC1 ou l'induction du complexe tuberous sclerosis complex (TSC2; Figure 7) qui agit alors en tant que GTPase-activating protein (GAP) et régule négativement le complexe mTORC1, ce qui déclenche l'autophagie (Zech et al., 2016). Quant au deuxième mécanisme, il consiste en une phosphorylation directe de Ser³¹⁷ et Ser⁷⁷⁷ de la kinase ULK1 par l'AMPK (J. Kim et al., 2011).

1.6.4.2.4. L'autophagie et son implication dans la MP

A l'échelle cellulaire, la présence d'un niveau basal d'autophagie est toujours nécessaire au maintien de l'homéostasie cellulaire (Swanson, 2006). De nombreuses études ont soulevé l'importance de l'autophagie au cours des maladies neurodégénératives (Banerjee et al., 2010, Frake et al., 2015, Komatsu et al., 2006, Liu et al., 2015, J. Nah et al., 2015b), au moment où d'autres travaux ont démontré qu'elle est plutôt préjudiciable aux neurones puisque son altération ou sa suractivation provoquent la mort neuronale (Banerjee et al., 2010, Bredesen et al., 2006, Bursch, 2001, Cheung et al., 2009, Kesidou et al., 2013, Martinez-Vicente et al., 2007, R. Shi et al., 2012, L. Yu et al., 2004). Cette controverse a suscité l'intérêt de plusieurs groupes de recherche sur le véritable rôle que joue l'autophagie au cours des maladies neurodégénératives incluant la MP (Cheung et al., 2009, Nixon, 2007, Walter et al., 2016, L. Zhang et al., 2012).

Au cours de la MP, l'autophagie s'avère indispensable à l'épuration des molécules obsolètes, des organites défectueux et des agrégats protéiques contenus dans les neurones en vue de favoriser leur survie. Des études postmortem effectuées sur des cerveaux de patients parkinsoniens ont montré la présence d'autophagosomes et d'inclusions cytoplasmiques au niveau des neurones dopaminergiques de la région nigrostriée (Anglade et al., 1997, Baba et al., 1998, Levy et al., 2009, J. H. Zhu et al., 2003a). Ces inclusions renferment un ensemble de protéines mal repliées et agrégées, telles que la protéine probable G-protein coupled receptor 37 (GPR37) et l' α -synucléine, qui sont éliminées par autophagie pour prévenir toute perte neuronale (Arima et al., 1999, Baba et al., 1998, Hattori et al., 2005, Marazziti et al., 2009). En conditions physiologiques, les oligomères d' α -synucléine sont éliminés par la macroautophagie et la CMA (Vogiatzi et al., 2008, Webb et al., 2003). Néanmoins, sous sa forme agrégée, l' α -synucléine inhibe la CMA et c'est la macroautophagie qui prend le relais. En outre, au début de la MP, l'autophagie est également impliquée dans le renouvellement des mitochondries par l'élimination de celles qui sont défectueuses. Chez les parkinsoniens, il est connu que l'activité du complexe I est altérée, ce qui conduit à la libération de facteurs apoptogènes (Schapira et al., 1990). En particulier, il a été montré que Parkin, qui est impliquée dans le maintien de l'intégrité des mitochondries, a recours à la

mitophagie (autophagie médiée par les mitochondries) afin de dégrader les mitochondries altérées (Cheung et al., 2009, Darios et al., 2003, Narendra et al., 2008). De même, l'inactivation dans des cellules de neuroblastomes humains SH-SY5Y, du gène PINK1 impliqué également dans le maintien de l'homéostasie mitochondriale, a montré une activation de l'autophagie/mitophagie (Dagda et al., 2009), puisque celle-ci est induite en vue de restaurer le niveau basal en mitochondries en recyclant, entre autres, celles qui sont devenues défectueuses.

Bien que ces études et plusieurs autres travaux appuient le rôle neuroprotecteur de l'autophagie au cours des pathologies neurodégénératives (Arduino et al., 2012, Hochfeld et al., 2013, T. Pan et al., 2009), celle-ci peut néanmoins être un médiateur de mort cellulaire avec la progression de la maladie (Bredesen et al., 2006, Gomez-Santos et al., 2003, L. Yu et al., 2004). Il fut rapporté qu'un dérèglement du processus autophagique, lequel peut résulter d'une altération causant une activité à la baisse ou une suractivation, peut être associé à un stade avancé de la MP et contribuer à sa progression (Banerjee et al., 2010, Bredesen et al., 2006, Cherra et al., 2008, Stefanis et al., 2001, Xiong et al., 2013). En particulier, le dysfonctionnement mitochondrial fait partie intégrante du de la MP où il est impliqué dans la modulation de l'autophagie (Y. C. Su et al., 2013). En conditions normales, les mitochondries altérées activent la mitophagie en vue d'être éliminées et ainsi prévenir la libération des facteurs proapoptotiques mitochondriaux (Perier et al., 2012, Tait et al., 2010). Toutefois, à un stade avancé de la maladie, une exacerbation de la dérégulation mitochondriale peut altérer l'autophagie/mitophagie (Y. C. Su et al., 2013, J. J. Wu et al., 2009). Il en est de même avec la présence de mutations dans les gènes qui codent pour des protéines impliquées dans le maintien des mitochondries telles que Parkin et PINK1 (Perier et al., 2012), et la voie lysosomale autophagique incluant la bêta-glucosidase acide (GBA1 ; Moors et al., 2017) qui peuvent être à l'origine de l'interruption du flux autophagique.

En réponse aux modulations induites au niveau du processus autophagique, ce dernier se trouve incapable de maintenir le métabolisme cellulaire, ce qui entraîne la mort neuronale. Par conséquent, une accumulation des protéines agrégées et obsolètes se produirait dans le cytoplasme des neurones dopaminergiques (Batlevi et al., 2011). De

même, la libération des facteurs proapoptotiques par les mitochondries endommagées qui étaient destinées à être éliminées par la mitophagie déclenche la mise en place du processus apoptotique (Tait et al., 2010). Ces dernières libèrent également des ERO qui fragilisent les membranes lysosomales libérant ainsi des enzymes catalytiques incluant les cathepsines A responsables de l'activation des caspases effectrices telles que la caspase-3 (Dehay et al., 2010). L'altération du flux autophagique amène également au blocage des autophagosomes formés à l'étape de l'élongation conduisant de ce fait à la libération de la cargaison séquestrée, ce qui accentue les dommages cellulaires (Moors et al., 2017, Q. Yang et al., 2010a). D'un autre côté, l'activation excessive de l'autophagie a également été mise en évidence dans plusieurs pathologies dont la MP (Moors et al., 2017, Puyal et al., 2012). Ces travaux et d'autres études suggèrent que l'activation aberrante de l'autophagie entraînerait l'élimination des organites intacts et épuiserait les réserves en énergie, ce qui affaiblirait la cellule et perturberait son homéostasie, causant ainsi sa perte (Chu, 2006, Kesidou et al., 2013, Moors et al., 2017).

Au final, en se basant sur les données postmortem obtenues à partir de cerveaux de patients atteints de la MP et sur les études effectuées *in vitro* et *in vivo*, nous pouvons constater que le processus autophagique est neuroprotecteur vis-à-vis de la MP puisqu'il est impliqué dans le maintien du métabolisme cellulaire en éliminant les protéines anormalement repliées et en recyclant les organites défectueux. Toutefois, dans des conditions de stress chronique et/ou sous l'action de plusieurs facteurs provoquant une altération du processus, l'autophagie devient fatale aux neurones. Bien que l'utilisation d'inducteurs et d'inhibiteurs de l'autophagie dans des modèles mimant la MP ait révélé pour ces composés des propriétés parfois étonnantes, ceux-ci jusqu'à maintenant se sont avérés inefficaces cliniquement (Moors et al., 2017) puisqu'au cours de cette pathologie, l'autophagie nécessite un équilibre entre son activation et son inhibition (Moors et al., 2017). Une régulation plus spécifique des facteurs impliqués dans l'altération du processus autophagique serait donc une approche possible pour faire face à ce dilemme.

1.7. Thérapies et limitations

Malgré les nombreuses recherches entreprises depuis plusieurs décennies, il n'existe toujours pas de traitement curatif ou stabilisateur de façon permanente sans

effets secondaires débilissants à moyen ou long terme pour la MP. Au mieux, des stratégies thérapeutiques sont utilisées pour le traitement symptomatologique de la maladie. La principale d'entre elles consiste à compenser le déficit en DA par l'administration de L-dopa aux patients parkinsoniens (Cotzias et al., 1967, 1969). Dans un premier temps, ce traitement améliore les symptômes moteurs mais son efficacité s'estompe à long terme et son action bénéfique est compromise par l'apparition de complications importantes avec, en particulier, des fluctuations motrices et des mouvements anormaux involontaires ou dyskinésies. Ces effets indésirables de la dopathérapie ont donc conduit à la recherche d'autres pistes thérapeutiques alternatives de nature médicamenteuse ou chirurgicale.

Une amélioration de la prise en charge des patients parkinsoniens a été rendue possible avec l'utilisation, d'une part de molécules mimant l'effet de la DA, notamment des agonistes dopaminergiques incluant des dérivés de l'ergot de seigle (Tintner et al., 2003) et des antagonistes des récepteurs NMDA comme l'amantadine (Verhagen Metman et al., 1998), et d'autre part, de molécules limitant la dégradation de la DA comme les inhibiteurs de la MAO-B (Riederer et al., 2011). L'ensemble de ces médicaments a montré un effet bénéfique pour le traitement symptomatique de la MP. De même, l'approche neurochirurgicale de stimulation cérébrale s'est avérée très efficace depuis le début des années 90 pour permettre la récupération d'une bonne motricité chez les patients parkinsoniens (Benabid et al., 1994, Limousin et al., 1995). Cette intervention consiste à implanter deux électrodes dans chaque hémisphère du cerveau afin de stimuler simultanément les NST. Celles-ci vont alors désynchroniser les neurones du NST qui sont anormalement synchronisés chez les patients parkinsoniens. Les résultats de cette opération sont assez spectaculaires puisque l'on note une amélioration significative au niveau des tremblements, de la rigidité et des troubles du mouvement (Benabid et al., 2003). Toutefois, en raison de la lourdeur de cette intervention, elle n'est réalisable que chez un nombre réduit de patients remplissant certains critères bien précis.

Bien que l'ensemble de ces traitements améliore la qualité de vie des patients ainsi que celle de leur entourage, ils ne visent qu'à compenser le déficit dopaminergique et ses conséquences. Malheureusement, ils ne peuvent en revanche, ni ralentir, ni arrêter la

progression inéluctable de la maladie. La recherche de nouvelles approches thérapeutiques visant à stopper la progression de la MP, et même à stimuler la régénération de la SN atteinte, est par conséquent nécessaire pour éliminer les dommages physiologiques rencontrés au cours de cette pathologie.

2. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide

2.1. Généralités

Le Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) est un neuropeptide isolé pour la première fois à partir d'extraits hypothalamiques ovins pour sa capacité à stimuler la formation d'AMPc dans des cellules hypophysaires de rat en culture (Miyata et al., 1989). Il existe deux isoformes biologiquement actives du PACAP à savoir le PACAP38 et le PACAP27, qui sont issues du clivage d'une même prépro-protéine de 176 acides aminés codée chez l'homme par un gène situé au niveau de la région P11 du chromosome 18 (Hosoya et al., 1992). De façon intéressante, tant au niveau du système nerveux central que dans les tissus périphériques, les dosages radioimmunologiques effectués chez le rat ont montré que le PACAP38 représente la forme moléculaire prépondérante; son dérivé de 27 résidus ne représentant qu'une partie mineure de l'immunoréactivité totale du PACAP (Arimura et al., 1991). Néanmoins, ce rapport est tissu-dépendant et ces proportions peuvent varier en fonction des organes. La structure primaire du PACAP27, qui correspond aux 27 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale du PACAP38, présente 68% d'identité avec celle du Vasoactive Intestinal Peptide (VIP). Cette forte homologie de séquence a ainsi permis de classer le PACAP parmi les membres de la superfamille VIP/GRF/glucagon (Figure 8 ; Vaudry et al., 2000b).

PACAP38	HSDGI F TDSSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVK NK -NH2
PACAP27	HSDGI F TDSSYSRYRKQMAVKKYLAAVLVIP-NH2
VIP	HSDAV F TDNYTRLRKQMAVKKYL NSILN -NH2
Sécrétine	HSDGT F TSELSRLREGARLQRL LQGLV -NH2
GRF	YADAI F TNSYSKVLGQLSARKLLQDIMSRQ QGESNQ ERGARARL-NH2
Hélodermine	HSDAI F T EEYSKLLAKLALQKYL ASILGSRTS PPP -NH2
Glucagon	HSQGT F TS DYSKYLD SRRAQDFVQ WLMNT
GLP-2	HADGS F SDEMNTILDNL AARD FINWLIQTKITD
GIP	YAEGT F ISDYSIAMDKIHQ QDFN WLLAQKGK KNDWKHNITQ

Figure 8. Séquences des principaux membres de la superfamille VIP/GRF/Glucagon retrouvés chez l'homme.

Le résidu en rouge représente la phénylalanine (indispensable à la liaison/activation aux récepteurs) et elle est présente chez toutes les espèces. Les résidus en vert diffèrent de ceux retrouvés dans le PACAP38. Modifiée d'après Vaudry et al., 2000b.

D'un point de vue phylogénétique, la structure primaire du PACAP a été remarquablement conservée au cours de l'évolution (Figure 9). Les rares variations de séquences observées chez certains vertébrés le sont principalement dans le domaine C-terminal 28-38 alors que le segment N-terminal de 27 résidus est identique dans la majorité des espèces. Cette pression évolutive visant à conserver intacte la structure primaire du PACAP suggère un rôle physiologique important pour ce peptide (Vaudry et al., 2000b).

	1	5	10	15	20	25	30	35	% d'homologie	
Mammifères	HSDGIFTDSSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKNK									100%
Poulet	-I-	-----								97%
Lézard	-----	-----								100%
Grenouille	-----	-----I---								97%
Saumon	-----	-----R--YR-								92%

Figure 9. Comparaison des séquences en acides aminés du PACAP38 chez différentes espèces.

La séquence du peptide est remarquablement bien conservée des poissons jusqu'aux mammifères. Modifiée d'après Vaudry et al., 2000b.

2.2. Localisation tissulaire du PACAP

Le PACAP exerce un ensemble d'effets biologiques au niveau de l'organisme où il se comporte comme une hormone hypothalamique, un neuromodulateur, un facteur

neurotrophique et un neurotransmetteur (Shioda, 2000). En accord avec ces multiples fonctions, des dosages radioimmunologiques (RIA) et des études d'hybridation in situ ont démontré que le PACAP est profusément distribué au niveau du SNC des mammifères (Arimura et al., 1991, Ghatei et al., 1993). En effet, le PACAP ainsi que son ARNm sont fortement exprimés dans l'hypothalamus et dans de nombreuses régions extra-hypothalamiques telles que le cortex cérébral, le thalamus, le striatum, le noyau accumbens, la SN, le locus cœruleus, la glande pinéale, le cervelet et le pont (Ghatei et al., 1993, J. Hannibal et al., 1995, Y. Masuo et al., 1993, Piggins et al., 1996, Vaudry et al., 2009). Il a aussi été montré au niveau du mésencéphale que des neurones immunoréactifs au PACAP sont localisés dans la substance grise périaqueducule (Das et al., 2007). De même, Chung et al. ont mis en évidence des niveaux significativement élevés de l'ARNm du PACAP au niveau des neurones dopaminergiques de la population A10 de l'aire tegmentale ventrale (Chee Yeun Chung et al., 2005b). En outre, le PACAP est également synthétisé en abondance dans divers organes et tissus périphériques incluant notamment les systèmes cardiovasculaire, respiratoire, digestif, reproducteur et urinaire, ainsi que dans de nombreux tissus associés au système lymphoïde incluant le thymus, la moelle osseuse et la rate (Vaudry et al., 2009).

2.3. Récepteurs du PACAP : localisation et activation

Le PACAP constitue le ligand endogène de deux types de sites de liaison différents correspondant à trois récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G, dénommés PAC1, VPAC1 et VPAC2 (Figure 10 ; Harmar et al., 1998). Le récepteur PAC1 est hautement sélectif pour le PACAP, avec notamment une affinité 1000 fois plus élevée pour les deux formes natives du PACAP que pour le VIP (Vaudry et al., 2000b). En revanche, les récepteurs VPAC1 et VPAC2 possèdent des affinités similaires envers les trois peptides (PACAP38, PACAP27 et VIP ; Basille et al., 1994). En outre, il existe d'autres agonistes PAC1 sélectifs et ceux-ci sont aussi puissants que le PACAP, tels que le Maxadilan (Moro et al., 1997) et le MPAP0 (Ma et al., 2015). Le Maxadilan, un peptide de 61 acides aminés, a été isolé à partir de la glande salivaire de la mouche *Lutzomyia longipalpis*. Il est dépourvu de toute similarité de séquence avec le PACAP et il est étonnamment puissant comme agoniste du récepteur PAC1. Il a été montré que ce dernier possède aussi une puissante activité vasodilatatrice qui s'avère provenir de

l'activation d'autres récepteurs. Cette observation, jumelée à sa taille, limite évidemment son utilisation comme gabarit moléculaire pour le développement de médicaments pour traiter des pathologies neurodégénératives. Aussi, le MPAPO, un nouveau peptide recombinant dérivé du PACAP, a été conçu en 2015 par Ma et al. Celui-ci apparaît également comme un puissant agoniste PAC1 sélectif, avec une stabilité chimique plus élevée que celle du PACAP27 en milieu aqueux. Ce peptide est obtenu au moyen d'une recombinaison génétique réalisée au niveau du gène du PACAP qui, une fois exprimé, produit un peptide possédant un résidu Met au niveau du segment N-terminal, un résidu Leu en position 17 et enfin des résidus Lys aux positions 27 et 28. Selon la description des auteurs, le MPAPO possède des effets neurotrophiques significatifs.

Par ailleurs, les différents récepteurs appartiennent tous à la classe B de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), laquelle se caractérise par des récepteurs comprenant un large domaine N-terminal extracellulaire et un domaine transmembranaire composé de sept hélices α (Poyner et al., 2012). Tout comme le PACAP, les récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2 sont localisés tant au niveau du SNC qu'en périphérie. Néanmoins, au niveau central, le PAC1 est nettement plus présent que les récepteurs VPAC1 et VPAC2 (Vaudry et al., 2000b). Chez le rat, il a été montré que les trois récepteurs sont abondamment présents au niveau du bulbe olfactif, du cortex cérébral, du septum et dans le gyrus denté (Jens Hannibal, 2002). Au niveau cellulaire, les récepteurs du PACAP ont été décrits également dans les astrocytes (Tatsuno et al., 1990). En outre, des quantités significatives de l'ARNm du PAC1 ont été retrouvées dans d'autres régions cérébrales telles que le cortex frontal et pariétal, les ganglions de la base, la glande pinéale et l'hypothalamus (Yoshinori Masuo et al., 1992). Au niveau du mésencéphale, le PAC1 est profusément localisé dans le noyau gris central, la SN et le colliculus supérieur. De façon intéressante, la présence du système PACAPergique au niveau des ganglions de base, et plus spécifiquement au niveau de la SN, témoigne d'une implication probable du PACAP et de ses effets neuroprotecteurs dans la MP. À l'opposé de la localisation des différents types de liaison du PACAP au niveau du SNC, au niveau périphérique, les trois récepteurs sont abondamment exprimés et leur distribution relative est tissus-dépendante (Busto et al., 2000, Valiante et al., 2009, Vaudry et al., 2000b).

Par ailleurs, le système PACAPergique provoque divers effets physiologiques par l'intermédiaire de différentes cascades de signalisation activées après la liaison du ligand à l'un et/ou l'autre des trois récepteurs couplé à des protéines G hétérotrimériques (Figure 10). D'une part, la fixation du PACAP sur l'extrémité N-terminale extracellulaire du PAC1 va généralement induire le recrutement des protéines Gs et Gq qui, en retour, vont respectivement stimuler l'adénylyl cyclase, et donc la production de l'AMPc, et la voie de la phospholipase C (PLC)/inositol triphosphate (IP3)/diacyglycérol (DAG) qui conduit alors à la libération du Ca²⁺ intracellulaire (Figure 10 ; Hoare, 2005, Vaudry et al., 2000b). À noter cependant, vu l'existence de plusieurs variants du récepteur PAC1, que l'activation de ces voies n'est pas systématique (Journot et al., 1995, Lutz et al., 2006, Spengler et al., 1993). D'autre part, l'activation des récepteurs VPAC par le PACAP recrute préférentiellement la protéine Gs qui active généralement l'adénylyl cyclase (Langer, 2012). En revanche, des études antérieures effectuées sur des cellules exprimant d'une manière endogène les récepteurs VPAC, ou des lignées cellulaires transfectées, ont également mis en évidence l'implication de ceux-ci dans l'activation de la PLC et la mobilisation calcique (Langer, 2012, MacKenzie et al., 2001). Vu la divergence des données obtenues, les mécanismes impliqués dans l'activation de la voie PLC restent imprécis (Langer, 2012).

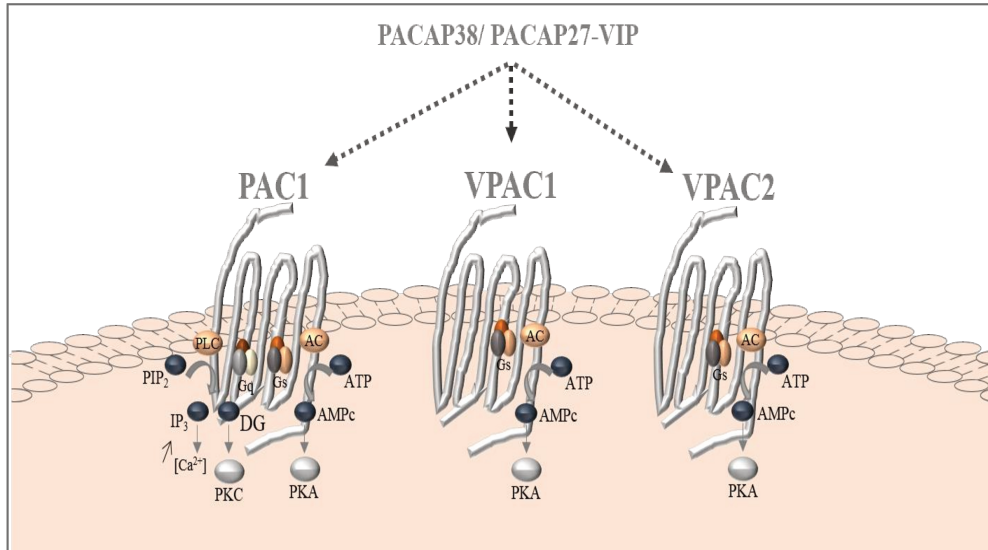


Figure 10. Représentation schématique des récepteurs du PACAP : PAC1, VPAC1 et VPAC2

PACAP, pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide; VIP, vasoactive intestinal peptide; AC, adénylyl cyclase; ATP, adénosine triphosphate; AMPc, adénosine monophosphate cyclique; PKA, protéine kinase A; Gs, protéine G stimulatrice; Gq, protéine G stimulant la PLC; PLC, phospholipase C; PIP₂, phosphatidylinositol bisphosphate; DAG, diacylglycérol; PKC, protéine kinase C; IP₃, inositol triphosphate; Ca²⁺ calcium.

2.4. Activités biologiques du PACAP

La distribution ubiquitaire du PACAP et de ses récepteurs suggère que ce système est impliqué dans la régulation de nombreux processus physiologiques (Vaudry et al., 2009). En particulier, ce dernier interviendrait dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation, et de la survie cellulaire au niveau du SNC (Shioda et al., 2006). Au cours du développement cérébral, le PACAP contribue à la formation du tube neural (Waschek et al., 1998) et favorise ainsi la prolifération de certains neurones (Mercer et al., 2004). Le PACAP est également capable d'induire la différenciation de cellules souches murines embryonnaires en astrocytes via l'activation de son récepteur PAC1 (Watanabe et al., 2006). De même, son implication dans l'ontogenèse du cerveau et du cervelet a été largement étudiée (Basille et al., 2006, Basille et al., 1994, Gonzalez et al., 1996, Y. Masuo et al., 1994, Mathieu et al., 2001, C. J. Zhou et al., 2000).

Outre ses activités neurotrophiques, le système PACAPergique est également impliqué dans la régulation de multiples effets physiologiques au niveau périphérique. Notamment, au niveau du système respiratoire, il a été montré que le PACAP est capable

d'inhiber la bronchoconstriction causée par l'histamine chez les cochons d'Inde (Linden et al., 1995, Saguchi et al., 1997). Au niveau du système cardiovasculaire, divers travaux antérieurs ont mis en évidence l'effet vasodilatateur du PACAP qui était associé avec une diminution de la PAM dans plusieurs modèles animaux. En effet, des injections transitoires de PACAP effectuées chez la souris ont induit une chute de la pression artérielle moyenne et cérébrale (Ohtaki et al., 2004). De même, une administration de l'une ou l'autre des deux isoformes du peptide en iv a engendré chez le chien une hypotension suivie d'une augmentation de la fréquence cardiaque (Ishizuka et al., 1992). L'effet chronotrope du PACAP a également été mis en évidence par d'autres études faisant de ce peptide un candidat cardiotonique efficace pour le traitement de l'insuffisance cardiaque (Birk et al., 2007, Minkes et al., 1992, Sawangjaroen et al., 1994, Sawangjaroen et al., 1992, Vaudry et al., 2009).

Au niveau du système immunitaire, l'effet anti-inflammatoire du PACAP a été largement documenté par plusieurs travaux. Par exemple, chez la souris, ce dernier est capable d'améliorer la phagocytose exécutée par les macrophages (Ichinose et al., 1995). De plus, dans plusieurs modèles cellulaires, le PACAP peut empêcher la libération des cytokines pro-inflammatoires par les lymphocytes (Linden et al., 1999, Martinez et al., 1996, H. Tang et al., 1996).

Vu l'abondance des activités biologiques exercées par le système PACAPergique sur le SNC et les systèmes périphériques, nous nous sommes limités à ne citer que quelques exemples. La description exhaustive de ces effets peut être retrouvée dans différentes revues (Moody et al., 2011, Vaudry et al., 2009).

2.5. Effets neuroprotecteurs du PACAP

Plusieurs études in vitro ont mis en évidence l'effet neuroprotecteur du PACAP vis-à-vis de plusieurs modèles de neurotoxicité. Par exemple, celui-ci exerce un effet antiapoptotique contre la neurotoxicité induite par le peroxyde d'hydrogène (Masmoudi-Kouki et al., 2011, Racz et al., 2010, Vaudry et al., 2002a), l'éthanol (Manavalan et al., 2017, Vaudry et al., 2002b), les céramides (Vaudry et al., 2003), le salsolinol (Brown et al., 2013) et la privation en potassium extracellulaire (J. Y. Chang et al., 1996, Villalba et al., 1997), sur plusieurs types cellulaires incluant les neurones en grain et les

neuroblastomes humains SH-SY5Y. Par sa pléiotropie, le PACAP peut moduler plusieurs processus délétères favorisant ainsi la survie cellulaire. À cet effet, divers travaux, tant in vitro qu'in vivo, ont révélé son action neuroprotectrice dans plusieurs modèles d'excitotoxicité (Tamas et al., 2006a) et de neuro-inflammation, ainsi qu'au niveau de diverses pathologies neurodégénératives.

Modèles d'excitotoxicité

Il fut ainsi démontré in vitro chez le rat que le PACAP protège les neurones rétiniens, les neurones corticaux et les cellules de phéochromocytomes (PC12) contre l'effet excitotoxique du glutamate (Morio et al., 1996, Said et al., 1998, Shintani et al., 2005, Shoge et al., 1999). In vivo, le PACAP s'oppose également aux effets neurotoxiques du glutamate monosodique (MSG) sur les neurones rétiniens de rats nouveau-nés (Babai et al., 2005, Racz et al., 2006). Sur ce même modèle animal, l'équipe de Reglodi a montré que le peptide rétablissait non seulement l'aspect morphologique de la rétine mais aussi son état fonctionnel (Varga et al., 2011). De même, une injection microiontophorétique de PACAP a pu réduire l'excitotoxicité induite par l'acide kaïnique chez des rats Long-Evans (Atlasz et al., 2006).

Modèles de neuro-inflammation

Le processus neuro-inflammatoire occupe une place prépondérante dans la physiopathologie de plusieurs atteintes où celui-ci peut s'avérer régénérateur ou encore destructeur. À ce titre, outre ses effets sur l'excitotoxicité, le PACAP peut également agir sur la réponse inflammatoire et atténuer la mort neuronale. Ainsi, avec des concentrations femtomolaires de PACAP, il fut montré que ce peptide est capable de s'opposer aux effets pro-inflammatoires et neurotoxiques induits par les LPS sur une culture mixte de neurones corticaux et de cellules gliales (Kong et al., 1999). Cette action à la fois anti-inflammatoire et neuroprotectrice fut également observée sur des cellules de neuroblastomes humains SH-SY5Y ayant été incubées dans un milieu conditionné de monocytes, traitées avec une combinaison de LPS et d'IFN- γ (Brown et al., 2014).

Ainsi, divers groupes de recherche ont mis en évidence le potentiel neuroprotecteur du PACAP dans plusieurs pathologies dégénératives expérimentales incluant les traumatismes neurodégénératifs aigus (AVC, chocs traumatiques crâniens, etc.) et chroniques

(E. H. Lee et al., 2014a, Maasz et al., 2017, Reglodi et al., 2011, Shioda et al., 2015, Somogyvari-Vigh et al., 2004). À noter que l'ensemble de ces effets à l'origine de l'action neuroprotectrice du PACAP dans des modèles expérimentaux d'atteintes neurologiques sera décrit plus précisément subséquentement.

Modèles expérimentaux d'hypoxie et d'ischémie cérébrale

Des travaux réalisés in vitro et in vivo ont révélé que le PACAP est capable de prévenir la mort neuronale induite par hypoxie et par chocs ischémiques (Banks et al., 1996, Dejda et al., 2011, Reglodi et al., 2002, Suk et al., 2004, Uchida et al., 1996). En particulier, le PACAP protège les cellules PC-12 contre la neuro-inflammation et la neurotoxicité induites par l'activation microgliale engendrée par des conditions d'hypoxie (Suk et al., 2004). Également, il fut montré que l'injection iv du PACAP, même plusieurs heures après une ischémie cérébrale expérimentale transitoire, réduit considérablement le volume de la zone infarctée (Reglodi et al., 2000). Dans ces mêmes conditions, et en maintenant l'occlusion en permanence, des résultats fascinants ont été observés à la suite d'un prétraitement au PACAP. En effet, le peptide a non seulement diminué la taille de l'infarctus cérébral 24 h après le choc ischémique mais il a aussi réduit les déficits sensorimoteurs (Reglodi et al., 2002). Cet effet neuroprotecteur fut également confirmé par divers travaux effectués sur plusieurs modèles d'AVC (Y. Chen et al., 2006, Dejda et al., 2011, Jozwiak-Bebenista et al., 2008, Ohtaki et al., 2008). Par ailleurs, des effets neuroprotecteurs indirects liés au PACAP ont également été rapportés in vivo dans un modèle d'ischémie cérébrale. À cet effet, après avoir provoqué l'obstruction de l'artère cérébrale moyenne, il fut montré que le PACAP stimule l'expression de l'IL-6, laquelle est responsable de la phosphorylation du signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) qui, à son tour, induit l'expression de la protéine antiapoptotique Bcl-2. Cette dernière inhibe le relargage du cytochrome c et prévient la mort neuronale (Ohtaki et al., 2006).

2.5.1. PACAP et maladies neurodégénératives : exemple avec la MP

L'effet neuroprotecteur du PACAP a été abondamment décrit suite aux observations obtenues au moyen de divers modèles expérimentaux reproduisant des atteintes neurodégénératives telles la MA, la maladie de Huntington et la MP (Reglodi et al., 2011,

R. Yang et al., 2015). Par exemple, dans des modèles in vitro de la MA, il fut montré que le PACAP est capable de protéger les cellules PC-12 (Onoue et al., 2002a) et les cellules de neuroblastomes de souris (Neu-2a ; Gui et al., 2003) contre la neurotoxicité de la β -amyloïde. Similairement, dans un modèle expérimental de la maladie de Huntington, le peptide a également atténué l'excitotoxicité et les lésions unilatérales striatales ainsi que les troubles moteurs engendrés par l'acide quinolinique chez les rongeurs (Tamas et al., 2006a).

Vu l'existence d'un lien étroit entre la MP et le PACAP (Hashimoto et al., 1996, Palkovits et al., 1995, Takei et al., 1998), divers groupes de recherche ont focalisé leurs études sur le potentiel modulateur et neuroprotecteur des sources endogène et exogène du peptide sur plusieurs médiateurs neurotoxiques reproduisant des modèles expérimentaux de la MP. Il est connu que les neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral se composent de deux principales populations : (i) la population A9 qui siège dans la SN et est impliquée dans le contrôle de la motricité, et (ii) la population A10 qui est présente au niveau du tegmentum et qui intervient dans le contrôle des fonctions émotionnelles (McRitchie et al., 1996, Neuhoff et al., 2002). À cet effet, il fut montré que les neurones dopaminergiques de la population A9 dégénèrent préférentiellement au cours de la MP ou face à des agents neurotoxiques contrairement à ceux de la population A10 (C. Y. Chung et al., 2005a). La vulnérabilité de la population A9, comparée à celle A10, résulte de la différence des niveaux d'expression de gènes impliqués dans des mécanismes de neurotoxicité et de survie cellulaire. De ce fait, des études par puces à ADN et PCR quantitative, effectuées chez le rat sur les deux populations de neurones, ont révélé que les gènes codant certains peptides incluant la bombésine (gastrin-releasing peptide; GRP) et le PACAP étaient principalement exprimés au niveau de la population A10 (C. Y. Chung et al., 2005a). Ces mêmes travaux ont montré que le PACAP protège les cellules PC12 surexprimant l' α -synucléine et les neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral de rat contre la neurotoxicité du MPP⁺ (C. Y. Chung et al., 2005a). À la lumière de ces résultats et de ceux du groupe de Reglodi (Reglodi et al., 2004b), Chung et al. ont conclu que l'expression de certains peptides à caractère neuroprotecteur tels que le PACAP peut diminuer la vulnérabilité des populations A10 vis-à-vis des agents neurotoxiques et des atteintes

neurodégénératives telles que la MP (C. Y. Chung et al., 2005a). Ces résultats furent confirmés chez des souris invalidées pour le gène codant le PACAP après l'administration d'une dose de paraquat (herbicide neurotoxique) incapable d'engendrer une neurodégénérescence chez les souris sauvages (Watson et al., 2013). Ces souris ont montré non seulement une perte des neurones dopaminergiques mais aussi une régulation à la hausse de TNF- α . Chez ces mêmes souris, les auteurs ont révélé une augmentation du nombre des cellules immunitaires à caractère pro-inflammatoire telles que les lymphocytes Th17 et une altération de l'induction des lymphocytes T régulateurs qui sont dotés d'une activité anti-inflammatoire (Watson et al., 2013). Ces données témoignent de l'implication du PACAP endogène dans le maintien de l'intégrité des neurones dopaminergiques face aux agents neurotoxiques (Watson et al., 2013). À ce titre, il fut montré par l'équipe de Hunot et coll, par le biais d'études postmortem et de modèles expérimentaux de la MP, que les cerveaux de patients parkinsoniens ainsi que ceux issus de souris traitées avec le MPTP étaient envahis de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Brochard et al., 2008). Cette même étude a également démontré l'implication incontestable des lymphocytes T CD4⁺ dans la toxicité des neurones dopaminergiques. Dans ce contexte, le PACAP apparaît comme un agent efficace contre le processus neuro-inflammatoire accompagnant la MP.

En outre, diverses études *in vitro* et *in vivo* ont documenté l'action neuroprotectrice du PACAP exogène vis-à-vis des modèles expérimentaux de la MP. En particulier, celui-ci est capable de contrecarrer la neurotoxicité du MPP⁺ induite *in vitro* sur les cellules PC12 (C. Y. Chung et al., 2005a), les neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral de rat (C. Y. Chung et al., 2005a), les cultures mixtes de neurones et de cellules gliales du mésencéphale (S. Yang et al., 2006) et les cellules Neuro-2a (Deguil et al., 2007). De même, le PACAP atténue la mort neuronale des cellules PC12 induite par la roténone (G. Wang et al., 2005) et la 6-OHDA (Takei et al., 1998).

Ces effets neuroprotecteurs ont été également observés *in vivo* (Maasz et al., 2017, Reglodi et al., 2006a, Reglodi et al., 2004b, Reglodi et al., 2006b, Reglodi et al., 2004c). Par exemple, le PACAP protège de façon significative les neurones dopaminergiques contre la neurotoxicité de la 6-OHDA administrée chez le rat (Maasz et al., 2017, Reglodi

et al., 2006a, Reglodi et al., 2006b, Reglodi et al., 2004c). Fait intéressant, cet effet neuroprotecteur s'accompagne d'une amélioration significative des fonctions motrices (Reglodi et al., 2004b). De plus, le peptide prévient non seulement le déficit dopaminergique causé par la méthamphétamine, et ce, en augmentant l'expression des transporteurs vésiculaires des monoamines (VMAT2), mais aussi le stress oxydatif lié à la toxicité de cette drogue (Guillot et al., 2008). Au cours de cette même étude, Guillot et al. ont mis en évidence un puissant effet anti-inflammatoire du PACAP où celui-ci a réduit significativement l'astroglie et la microglie activée induites au niveau du striatum de souris traitées avec de la méthamphétamine. Dans ce même contexte, Delgado et al. ont également démontré que ce peptide prévient l'activation microgliale induite chez la souris dans un modèle expérimental de la MP (Delgado et al., 2003).

L'effet neuroprotecteur du PACAP a également été confirmé dans d'autres modèles expérimentaux de la MP utilisant le MPTP comme agent neurotoxique (Deguil et al., 2010, G. Wang et al., 2008a), puisqu'il a été montré que le peptide prévient le déclin cognitif engendré par cette substance (Deguil et al., 2010).

En tenant compte du large éventail des effets physiologiques qu'exerce le PACAP vis-à-vis des agents neurotoxiques et des atteintes neurologiques expérimentales, des travaux ont également mis en évidence une action antioxydante pour ce dernier (Douiri et al., 2016, Kasica et al., 2016, Racz et al., 2010, Reglodi et al., 2004a). Bien que diverses études aient révélé un ensemble d'actions neuroprotectrices du PACAP vis-à-vis de nombreux processus délétères incluant le stress oxydatif, l'excitotoxicité, la neuro-inflammation, l'apoptose, etc., son effet sur le processus autophagique n'a jamais été étudié. De ce fait, l'investigation de l'effet du PACAP sur l'autophagie devient une contribution significative pour une meilleure compréhension des mécanismes de neuroprotection médiés par le peptide au cours des maladies neurodégénératives, et notamment de la MP.

2.5.2. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet neuroprotecteur du PACAP

Il résulte de ce qui précède que le PACAP exerce un ensemble d'effets physiologiques conduisant à la protection des neurones dans divers modèles in vitro et

in vivo d'agressions cellulaires. Ces effets sont associés à une activation des récepteurs PACAPergiques, principalement le PAC1. Cependant, le potentiel neuroprotecteur du peptide peut dépendre de plusieurs facteurs. Parmi ceux-ci, nous identifions tout particulièrement le type cellulaire, le type de récepteur, le type de variant exprimé (PAC1), les concentrations en PACAP, etc. De plus, les mécanismes moléculaires impliqués dans ces effets neuroprotecteurs peuvent être directs ou indirects (Dejda et al., 2005, E. H. Lee et al., 2014a), selon l'agression cellulaire ou l'atteinte neurologique. C'est ainsi qu'il fut montré dans plusieurs études in vitro et in vivo que le PACAP exerce une action antiapoptotique en empruntant différentes voies de signalisation telles que la voie des MAP kinases, et ce, en activant le PAC1 (Aubert et al., 2006, Botia et al., 2007, Dohi et al., 2002, Pugh et al., 2006, Vaudry et al., 2000a, Villalba et al., 1997). Une fois activé, le récepteur PAC1 stimule l'adénylyl cyclase, ce qui provoque alors une augmentation d'AMPc à partir de l'ATP intracellulaire et contribue à l'activation de la PKA puis de la MAP kinase. À ce stade, l'activation de la MAP kinase peut être influencée par plusieurs facteurs, incluant le PACAP, qui engendrent l'induction ou l'inhibition des différents membres de la famille des MAP kinases dont, entre autres, l'extracellular signal regulated kinase (ERK), la JNK/stress activated protein kinase (SAPK) et la p38 (Dejda et al., 2005). Par exemple, dans un modèle reproduisant un AVC, l'effet antiapoptotique du PACAP passe par l'activation de la MAP kinase et l'inhibition de JNK/SAPK et de p38 (Dohi et al., 2002). Dans un autre modèle de neurotoxicité induite par les céramides, c'est la stimulation de l'expression du gène c-fos qui est mise en jeu dans l'action antiapoptotique du PACAP (Aubert et al., 2006). Ceci déclenchera la transcription de la protéine antiapoptotique Bcl-2. Cette dernière renforcera l'intégrité mitochondriale, inhibant ainsi le relargage du cytochrome c. À ce stade, l'association de ce dernier avec Apaf-1 n'est plus possible empêchant ainsi le clivage de la procaspase-9, ce qui a pour conséquence l'inhibition de la caspase-3 (Botia et al., 2007).

Il faut cependant souligner que l'action neuroprotectrice du PACAP peut impliquer d'autres voies de signalisation et divers médiateurs moléculaires. Par exemple, Vaudry et al. ont mis en évidence l'implication de la voie PLC dans l'effet antiapoptotique du PACAP vis-à-vis des neurones en grain (Vaudry et al., 2000a). En parallèle, le groupe de Del Rio a montré que la mort cellulaire des neurones corticaux induite par le NMDA est

atténuée par le BDNF, dont l'expression a été induite par le PACAP (Frechilla et al., 2001), tandis que l'effet neuroprotecteur du PACAP vis-à-vis de l'apoptose spontanée des neurones en grain est plutôt médié par la voie de la phosphatidylinositol-3'-OH kinase (PI3K ; Bhave et al., 2004).

Par ailleurs, plusieurs travaux antérieurs ont fait état de l'action neuroprotectrice indirecte du PACAP, et ce, en agissant sur les cellules gliales modulant ainsi la réponse inflammatoire (Delgado et al., 2003c, Gottschall et al., 1994, E. H. Lee et al., 2014a, Ohtaki et al., 2006). Il fut par exemple montré que le PACAP contrecarre les effets neurotoxiques et pro-inflammatoires des LPS, induits sur une culture mixte de neurones et de cellules gliales (préparée à partir du mésencéphale de l'embryon de souris), en bloquant la libération de TNF- α au niveau de la microglie (Delgado et al., 2003c). Dans cette étude, Delgado et coll. ont mis en évidence l'implication du récepteur VPAC1 dans la neuroprotection médiée par le PACAP. Également, plusieurs études ont rapporté d'autres mécanismes moléculaires intervenant dans l'effet neuroprotecteur du PACAP. Il fut ainsi montré, dans un modèle expérimental de la MP reproduit par le MPTP, que le potentiel neuroprotecteur du PACAP est aussi médié par la régulation sélective des récepteurs dopaminergiques D2 et de celle des sous-unités des canaux potassiques sensibles à l'ATP (G. Wang et al., 2008a). De même, au moyen de ce modèle de neurodégénérescence, Pain et coll. ont montré que le PACAP est capable de contrecarrer l'altération du contrôle traductionnel induite par le MPTP, et ce, en modulant la voie antiapoptotique de mTOR et en inhibant la voie apoptotique médiée par la double-stranded RNA-protein dependent kinase (PKR ; Deguil et al., 2010).

En somme, nous pouvons conclure que le PACAP est un candidat prometteur pour traiter de manière curative et/ou préventive les maladies neurodégénératives incluant la MP. Toutefois, sa dégradation rapide et les effets secondaires liés à l'activation de son récepteur VPAC2 limitent son utilisation sur le plan clinique.

3. PACAP : Limites pour son utilisation actuelle sur le plan clinique

3.1. Stabilité et transport

Le PACAP est, comme toute substance de nature peptidique, sensible à la protéolyse. Au niveau de l'organisme, il peut être clivé par les endopeptidases

plasmatiques, incluant la trypsine. Néanmoins ce peptide est principalement dégradé par la dipeptidyl peptidase IV (DPP IV ; L. Zhu et al., 2003b). Étant membranaire et ubiquitaire, cette enzyme est connue par exemple pour son implication dans la régulation des incrétines, et ce, en libérant des dipeptides N-terminaux (Mentlein, 1999). Donc, au niveau de l'organisme, la DPP IV est capable de cliver le PACAP38 administré par voie systémique chez la souris et libérer ainsi le PACAP(3-38) et le PACAP(5-38 L. Zhu et al., 2003b). Il a été montré que ces peptides tronqués peuvent antagoniser la réponse médiée par le récepteur PAC1 (B. D. Green et al., 2006, Vandermeers et al., 1992). Par ailleurs, afin qu'il soit transporté de manière stable dans la circulation sanguine, il a été observé que l'isoforme PACAP38, et non le PACAP27, s'associe avec une protéine plasmatique appelée céruloplasmine (Tams et al., 1999). Cette différence est de toute évidence liée au segment peptidique 28-38. L'association du PACAP38 avec la céruloplasmine affecte son efficacité apparente (Tams et al., 1999). Enfin, il a été montré que la demi-vie du PACAP est comprise entre 2 et 10 min quand ce dernier est injecté chez l'homme ou la souris (M. Li et al., 2007a, L. Zhu et al., 2003b).

Au niveau de la circulation sanguine, les deux formes actives du PACAP sont capables de franchir efficacement la BHE de manière bidirectionnelle (Figure 11 ; Banks et al., 1993). Toutefois, ces dernières adoptent chacune un type de transport différent pouvant nécessiter ou non un transporteur. En particulier, il fut démontré que le PACAP27, comme d'autres membres de la superfamille VIP/PACAP/sécrétine, diffuse vers le cerveau de manière passive et non saturable (Figure 11 ; Dogrukol-Ak et al., 2004). À l'inverse, le groupe d'Arimura et celui de Tuncel ont décrit que le passage du PACAP38 se fait à travers la BHE via la PTS-6 (Figure 11 ; Banks et al., 1993, Dogrukol-Ak et al., 2004). Cette étude a montré que nonobstant la grande taille et la faible lipophilicité du PACAP38, sa vitesse à franchir la BHE est augmentée de 30% comparée à celle du PACAP27, et ce, via ce transporteur saturable. Néanmoins, contrairement à ce qui a été révélé au sujet de la prédominance de la forme longue du PACAP endogène, un pourcentage plus élevé de l'isoforme PACAP27 est retrouvé au niveau du cerveau, quand les deux peptides sont administrés en iv. À ce chapitre, il semble donc que la prédominance de l'un par rapport à l'autre dépend de l'origine (endogène ou exogène)

des peptides. Ce paradoxe est probablement dû à la variabilité des profils pharmacocinétiques des deux isoformes (Banks et al., 1993).

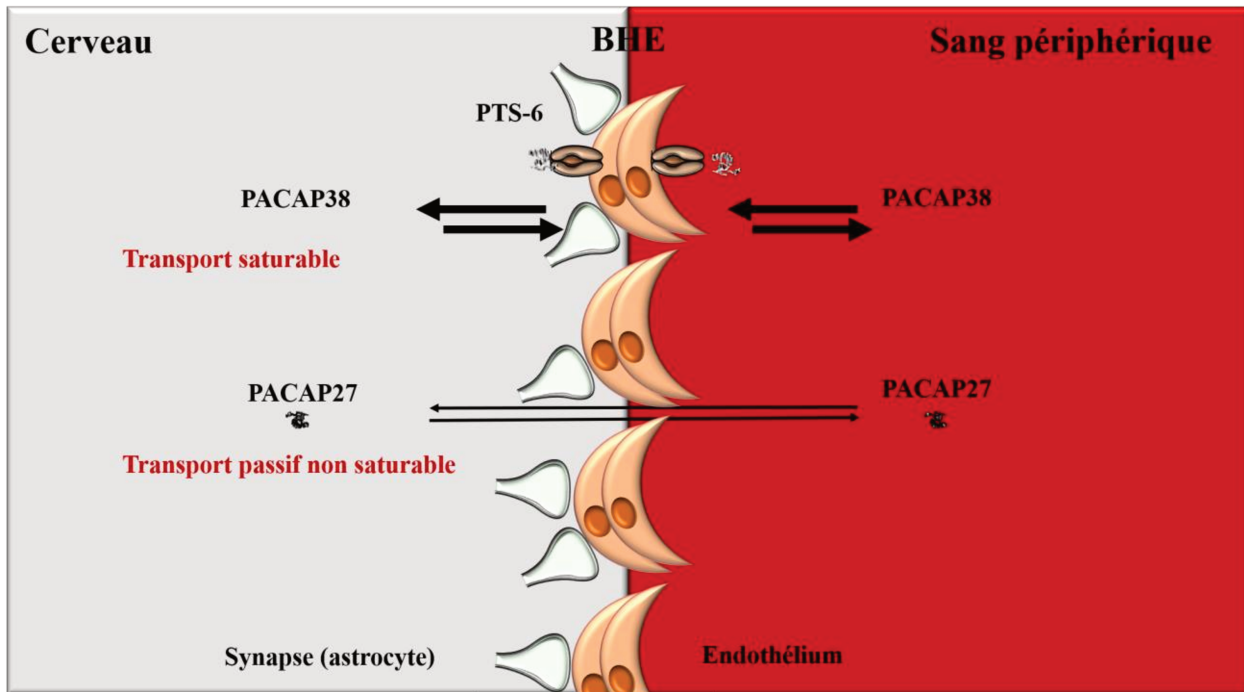


Figure 11. Schéma simplifié du passage du PACAP à travers la BHE.

Le PACAP38 franchit la BHE dans les deux directions via un transport saturable assuré par la PTS-6 tandis que le PACAP27 diffuse de manière bidirectionnelle à travers la BHE par un transport passif non saturable.

Bien que l'efficacité du PACAP à traverser la BHE soit opportune pour une éventuelle thérapie de certaines atteintes neurologiques, son transport bidirectionnel au travers cette dernière ou entre différentes régions cervicales peut être sujet à des modifications pouvant influencer sa biodisponibilité, et par conséquent affecter son action neuroprotectrice (Nonaka et al., 2002). Par exemple, chez la souris SAMP8 utilisée comme un modèle expérimental de la MA, il a été montré que le transport du PACAP à travers les différentes régions du cerveau, incluant l'hypothalamus et l'hippocampe, est considérablement plus lent que chez la souris sauvage (Nonaka et al., 2002). De même, dans un modèle de lésion de la moelle épinière ou encore d'AVC, plusieurs groupes de recherche ont mis en évidence une altération du transporteur du PACAP ainsi que de ceux impliqués dans le transport d'autres peptides à travers la BHE (Banks et al., 1998, H. Mizushima et al., 1999, Nonaka et al., 2005, W. Pan et al., 1997, W. Pan et al., 2001, W. Pan et al., 2003, Somogyvari-Vigh et al., 2000). De ce fait, Dogrukol-Ak et al. ont

focalisé leurs travaux sur la modulation du transport PACAPergique. Ainsi, il fut montré dans des modèles expérimentaux reproduisant distinctement la MA dans un cas et un AVC dans l'autre, que l'utilisation d'un cocktail d'ADN antisens ciblant sélectivement la PTS-6 améliore le potentiel neuroprotecteur du PACAP (Dogrukol-Ak et al., 2009).

D'un autre côté, certaines agressions cellulaires peuvent ne pas affecter le transport du PACAP comme c'est le cas pour les LPS. En effet, l'infection des souris par les LPS provoque la libération de cytokines pro-inflammatoires et l'altération de la BHE, mais n'affecte en aucun cas le passage du PACAP radiomarqué. Ces données suggèrent ainsi que la PTS-6 peut délivrer au cerveau le PACAP à des doses thérapeutiques et suffisantes pour traiter des atteintes neurologiques à caractère neuro-inflammatoire, malgré une altération de la BHE (Nonaka et al., 2005).

3.2. Effets indésirables liés à l'activation du VPAC2

Le PACAP induit diverses fonctions biologiques médiées par l'activation de ses trois récepteurs (VPAC1, VPAC2 et PAC1) qui sont largement distribués dans l'organisme et qui démontrent des profils pharmacologiques distincts (Vaudry et al., 2009, Vaudry et al., 2000b). En effet, les actions neuroprotectrices du PACAP, incluant ses effets antiapoptotiques et anti-inflammatoires, sont médiées respectivement par l'activation de PAC1 et VPAC1 (Delgado et al., 2002, Kellogg et al., 2012, Vaudry et al., 2002a). Néanmoins, un ensemble d'effets pouvant être indésirables a été observé à la suite de l'activation du récepteur VPAC2 comme la vasodilatation (Fizanne et al., 2004, Grant et al., 2006, Warren et al., 1992), l'hypotension, l'augmentation de la fréquence cardiaque (Ishizuka et al., 1992, Nandha et al., 1991) et la rétention d'eau (Tsutsumi et al., 2002). En particulier, il a été montré chez 6 individus sains qu'une injection de PACAP au niveau de l'artère brachiale provoque un puissant effet vasodilatateur de longue durée (Warren et al., 1992). De même, chez le porc, une vasodilatation des artères basilaires a été observée à la suite de l'activation du récepteur VPAC2 par son agoniste le Ro-25-1553 ou par le VIP (Grant et al., 2006). Cette action est d'ailleurs inhibée par le PG-99-465, un antagoniste du récepteur VPAC2. Nandha et al. ont noté chez des rats anesthésiés un effet hypotenseur dose-dépendant et transitoire après une administration en bolus de PACAP27 ou de PACAP38 (Nandha et al., 1991). Une chute de la PAM ainsi qu'une

élévation de la fréquence cardiaque ont également été enregistrées chez des chiens anesthésiés de race Beagle après un traitement intraveineux au PACAP ou au VIP (Ishizuka et al., 1992). Étonnamment, ce groupe a rapporté que l'augmentation de la fréquence cardiaque était dose-dépendante pour le PACAP27 mais non pour le PACAP38. Ceci est peut-être dû à l'extension C-terminale 28-38. Ces variations cardiovasculaires ont également été accompagnées par une augmentation de la fréquence respiratoire. Enfin, il a été rapporté par d'autres équipes que le PACAP peut également induire des effets indésirables au niveau du système digestif (Filipsson et al., 1998, Filipsson et al., 1997, Tsutsumi et al., 2002). Particulièrement, il a été montré par Tsutsumi et al. (2002) que ce peptide ainsi que le VIP induisent une rétention d'eau et stimulent la biosynthèse de l'insuline en activant le récepteur VPAC2. Cet effet semble bénéfique pour les personnes souffrant de diabète de type 2. Néanmoins d'autres complications peuvent surgir en raison de la complexité de cette maladie chronique qui est souvent associée à d'autres pathologies telles que les AVC et les maladies neurodégénératives. Notamment, un agoniste du récepteur VPAC2 (Bay 55-9837), conçu pour traiter le diabète de type 2, a causé *in vivo* chez un modèle expérimental de diabète des lésions cérébrales importantes (Darsalia et al., 2013).

Au final, la faible stabilité métabolique du PACAP ainsi que les effets indésirables liés à l'activation du récepteur VPAC2 limitent son potentiel comme agent cliniquement efficace. À cet effet, des analogues métaboliquement stables, dépourvus d'affinité pour le récepteur VPAC2 et capables d'activer le récepteur PAC1 (effet antiapoptotique) ou simultanément les récepteurs PAC1 et VPAC1 (action anti-inflammatoire) seraient des outils thérapeutiques d'un grand intérêt dans le traitement de la MP.

3.3. PACAP et analogues : relation structure-activité

Des études conformationnelles effectuées par dichroïsme circulaire (DC) et résonance magnétique nucléaire (RMN) ont révélé que la structure secondaire du PACAP27 est principalement caractérisée par une conformation hélicoïdale dont la longueur varie en fonction des milieux d'analyse (Vaudry et al., 2009) tels que le méthanol (Inooka et al., 1992), le 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE 30% et 50% ; Gonzalez-Muniz et al., 2001, Wray et al., 1993) et des micelles de dodécylphosphocholine (Bourgault et al.,

2009b, Inooka et al., 2001). De façon similaire, il fut montré que la structure secondaire du PACAP38 reflète celle du PACAP27 et que son extension C-terminale 28-38 présente une courte hélice reliée à la région (1-27) par l'intermédiaire d'une charnière flexible (Vaudry et al., 2009, Wray et al., 1993). Il fut également observé que cette isoforme est composée de trois domaines dont le premier constitue le segment N-terminal (histidine-1 à aspartate-8) qui est caractérisé par une structure désordonnée lorsque le peptide est en solution. Le deuxième segment qui s'étend de la sérine-9 à la valine-26, est en hélice- α , avec un coude au niveau des résidus lysine situés aux positions 20 et 21. Quant au troisième domaine, il s'agit d'une courte queue à symétrie hélicoïdale, qui s'étend du résidu leucine-29 au résidu arginine-34 (Sze et al., 2007, Wray et al., 1993).

Des études de type structure-activité réalisées sur le PACAP ont montré que son activité biologique et sa sélectivité dépendent de l'arrangement moléculaire adopté par son extrémité N-terminale (Bourgault et al., 2009b, Doan et al., 2011, Gourlet et al., 1995). De plus, l'importance du segment N-terminal comme déterminant moléculaire lié à l'activité biologique et à la sélectivité du PACAP vis-à-vis de ses récepteurs a également été révélée par l'antagonisme observé avec des fragments tel le PACAP(6-38) (Robberecht et al., 1992), ainsi que par des analogues contenant des modifications chimiques dans cette région (Bourgault et al., 2009a, Bourgault et al., 2008b, Bourgault et al., 2009b, Doan et al., 2011, Fournier et al., 2016, Ramos-Alvarez et al., 2015). En effet, les données ont permis d'identifier les résidus histidine-1, aspartate-3 et phénylalanine-6 comme étant des acides aminés clés pour l'obtention d'une conformation appropriée garantissant non seulement une haute affinité mais aussi une activité biologique puissante. De plus, l'hydrophobicité de la position 6 avec le résidu phénylalanine joue un rôle prépondérant dans le maintien de la spécificité du PACAP envers les récepteurs PAC1 et VPAC1.

Il a été démontré que le segment N-terminal du PACAP est requis pour l'activation du récepteur PAC1, de même que pour celle du récepteur VPAC1. À cet effet, il fut entre autres montré que la suppression des résidus histidine-1 et sérine-2 affectait l'affinité du PACAP bien davantage pour VPAC1 que pour VPAC2 (Gourlet et al., 1995). De plus, des analogues du VIP et du PACAP, tronqués en C-terminal, ont montré une forte affinité

pour le VPAC1 contrairement à VPAC2 (Gourlet et al., 1998). Selon Robberecht et coll., ces données suggèrent que la structure hélicoïdale du côté C-terminal est essentielle pour l'interaction du PACAP et du VIP avec VPAC2 (Gourlet et al., 1998). Sur la base de ces données et des études de relation structure-activité (Bourgault et al., 2008a, Bourgault et al., 2008b, Bourgault et al., 2009b, Doan et al., 2011, Ramos-Alvarez et al., 2015), il est nécessaire de générer des analogues montrant l'une ou en partie les caractéristiques suivantes : (i) une stabilité améliorée, (ii) absence d'activité de type VPAC2, (iii) des activités biologiques médiées par le PAC1 ou les PAC1/VPAC1. À cet effet, notre équipe a précédemment identifié deux analogues dont les propriétés s'apparentent à celles désirées, à savoir les peptides [Ala⁷]PACAP27 et [Hyp²]PACAP27 (Hyp: hydroxyproline). Ces dérivés synthétiques sont PAC1/VPAC1-sélectifs mais sur le plan pharmacocinétique ces derniers présentent une faible stabilité métabolique. Ce problème peut néanmoins être contourné en ajoutant un groupement acétyle en N-terminal, comme démontré par Bourgault et al. (2008a). Cette modification abolit l'action de la DPP IV et augmente considérablement la stabilité métabolique du peptide qui atteint une demi-vie supérieure à 240 min. Aussi, les analogues du PACAP peuvent s'oxyder à cause de la présence du groupement -S-CH₃ au niveau de la chaîne latérale de la méthionine-17, ce qui nuit à leur stabilité chimique. Ce problème a été résolu par la substitution de la méthionine par un isostère non oxydable, la norleucine (Bourgault et al., 2009a). Cette approche avait notamment été utilisée par Cirino et al. dans une étude du cytochrome P450 (BM-3 heme domain) où le remplacement des résidus méthionine (13 résidus) au moyen de la norleucine avait amélioré son activité (Cirino et al., 2003).

4. Mise en situation, hypothèses et objectifs de recherche

Récemment, des efforts substantiels ont été réalisés afin de mieux comprendre la nature des dommages cellulaires et biochimiques qui se produisent lors des maladies neurodégénératives, incluant la MP. Le stress oxydatif, l'excitotoxicité et l'inflammation, ainsi que l'apoptose et le dérèglement de l'autophagie sont souvent considérés comme des éléments déclencheurs ou des cofacteurs dans la pathogenèse et/ou la progression de la MP (Ambrosi et al., 2014, Mosley et al., 2006, Przedborski, 2010, Venderova et al.,

2012). De ce fait, de nouvelles stratégies de traitements neuroprotecteurs ont été conçues et leur potentiel a été évalué en utilisant des modèles expérimentaux, ainsi que lors d'essais précliniques et cliniques (Athauda et al., 2015, Sarkar et al., 2016). De nombreuses classes de médicaments ont été étudiées (anti-inflammatoires, inhibiteurs calciques, antioxydants, facteurs de croissance, etc.), mais aucune de ces stratégies n'est vraiment apparue comme pleinement satisfaisante (Sarkar et al., 2016). Les traitements neuroprotecteurs sont à la pointe de l'innovation pour le traitement de pathologies neurodégénératives. Ces agents pourraient protéger les neurones contre la mort cellulaire induite au cours de la maladie et ainsi ralentir la progression de cette dernière. Plusieurs agents thérapeutiques sont actuellement à l'étude ou ont déjà été évalués cliniquement. Parmi eux, on retrouve notamment des dérivés antiapoptotiques (CEP 1347 et CTCT346), des agents antiglutamatergiques, des antioxydants, et des inhibiteurs de la MAO (Djaldetti et al., 2002, Sarkar et al., 2016, L. H. Wang et al., 2008b). De ce fait, une stratégie puissante pour traiter des maladies neurologiques invalidantes comme la MP pourrait être l'utilisation d'un médicament multicible présentant des propriétés neuroprotectrices et possédant la capacité de favoriser la régénération neuronale, (Chiocco et al., 2007, Seidl et al., 2011). Le PACAP, de par sa capacité unique à traverser la BHE, ses propriétés antiapoptotiques, antioxydantes et anti-inflammatoires, de même que sa propension à promouvoir la prolifération des cellules souches (Mercer et al., 2004), pourrait ouvrir de nouveaux horizons pour le développement de stratégies pour le traitement des maladies neurodégénératives. Toutefois, comme mentionné précédemment, le peptide présente certaines limitations d'ordre pharmacocinétique et pharmacologique, par exemple sa courte demi-vie, qui restreignent une possible utilisation clinique. De plus, l'activation du récepteur VPAC2 est à l'origine d'effets secondaires notamment liés à son action sur le système cardiovasculaire. À cet effet, dans la continuité de nos travaux ayant entre autres conduit à l'identification d'analogues PAC1/VPAC1-sélectifs, notre équipe a développé un dérivé de la forme courte du PACAP à savoir l'Ac-[Phe(PI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27). Les modifications chimiques introduites au niveau du peptide visaient à améliorer les stabilités métabolique et chimique, et à réduire l'affinité du PACAP27 pour le récepteur VPAC2. Quant à son pouvoir neuroprotecteur, celui-ci a été testé initialement in vitro dans un modèle de neurotoxicité induit par le MPP⁺

sur des cellules de neuroblastomes humains SH-SY5Y de phénotype dopaminergique. Suite aux résultats préliminaires, nous avons émis l'hypothèse que l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) pourrait non seulement exercer un effet neuroprotecteur in vitro suite à une agression neurotoxique avec du MPP⁺, mais aussi assurer une neuroprotection efficace dans un modèle in vivo où la MP est mimée par l'administration de MPTP. Afin de répondre à cette hypothèse, nous nous sommes fixés comme premier objectif d'étudier les effets pharmacologiques du PACAP et de son analogue de synthèse dans des modèles de MP in vitro et in vivo, en évaluant non seulement leur activité neuroprotectrice mais aussi leurs effets secondaires sur la PAM et la fréquence cardiaque (**Article 1**).

Il est connu que le PACAP est doté d'un ensemble de propriétés neuroprotectrices, notamment par son pouvoir antioxydant qui contrecarre le stress oxydatif, son activité anti-inflammatoire, ou encore son effet antiapoptotique. Une action antiautophagique a aussi été postulée pour ce peptide mais elle n'a pas encore été étudiée dans une situation où le processus autophagique serait dérégulé comme dans la MP. Dans ce contexte, il est connu que la neuroprotection induite par le PACAP est médiée principalement par l'activation du récepteur PAC1, ce qui provoque entre autres une production d'AMPc et l'activation de la PKA. À ce propos, il fut montré dans un modèle de neurotoxicité engendrée par le MPP⁺ que l'AMPc et la PKA sont capables de réguler le processus autophagique induit par cet agent neurotoxique. De plus, plusieurs études récentes ont rapporté que le PACAP atténue la mort cellulaire provoquée par le MPP⁺. L'ensemble de ces observations nous a amenés à émettre l'hypothèse que le PACAP module le mécanisme autophagique activé au cours d'un modèle expérimental de la MP. Dans le but de vérifier cette idée, nous nous sommes fixés comme second objectif d'explorer le niveau de participation du PACAP dans le processus autophagique activé par le MPP⁺ dans les cellules SH-SY5Y et par le MPTP suite à des injections iv à des souris C57Bl/6 (**Article 2**).

Article 1

'' Se réunir est un début ; rester ensemble est un progrès ; travailler ensemble est la réussite ''
Henry Ford

Chapitre 2 : Article 1

Characterizations of a synthetic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide analog displaying potent neuroprotective activity and reduced in vivo cardiovascular side effects in a Parkinson's disease model

Caractérisation d'un analogue de synthèse du pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide montrant une puissante activité neuroprotectrice et des effets moindres sur le système cardiovasculaire, in vivo, dans un modèle de la maladie de Parkinson

Asma Lamine ^{a, b, c}, Myriam Létourneau ^{a, b}, Ngoc Duc Doan ^{a, b}, Julie Maucotel ^{b, c}, Alain Couvineau ^d, Hubert Vaudry ^{b, c}, David Chatenet ^{a, 1}, David Vaudry ^{b, c, 1}, Alain Fournier ^{a, b, *, 1}

^a INRS – Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada

^b Laboratoire International Associé Samuel de Champlain, France/Canada

^c INSERM-U982, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, IRIB, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

^d INSERM U1149/Inflammation Research Center (CRI), Université Paris-Diderot, Faculté de Médecine Site Bichat, 16, rue H. Huchard, 75018 Paris, France

* Auteur pour correspondance :

Pr Alain Fournier

Institut National de la Recherche Scientifique

INRS – IAF, 531 boul. des Prairies, Laval, QC, Canada H7V 1B7

Téléphone : 1-450-687-5010 ext. 8816

Courriel : alain.fournier@iaf.inrs.ca

Cet article est publié dans **Neuropharmacology**, vol. 108, p. 440-450, 2015

DOI: [10.1016/j.neuropharm.2015.05.014](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.014)

Résumé de l'article en français

La maladie de Parkinson (MP), un syndrome neurodégénératif causé par des évènements délétères tels que le stress oxydatif et la neuro-inflammation, mène à la destruction des neurones dopaminergiques, notamment par apoptose. Dans ce contexte, le pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), avec sa capacité à traverser la barrière hémocéphalique et ses propriétés antiapoptotiques, anti-inflammatoires et antioxydantes, est capable d'exercer une puissante activité neuroprotectrice dans divers modèles de la MP. Néanmoins, ses profils pharmacologiques (par exemple, ses effets indésirables liés au récepteur VPAC2) et pharmacocinétiques (faible stabilité métabolique) empêchent son utilisation clinique. Dans une perspective de développement d'une nouvelle approche thérapeutique, nous avons conçu un dérivé du PACAP, à savoir l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) comme composé neuroprotecteur possédant des profils pharmacologiques et métaboliques améliorés. In vitro, cet analogue stimule efficacement la production d'AMPc et atténue très significativement l'altération de l'activité mitochondriale causée par l'agent neurotoxique, le 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP⁺), lequel provoque la mort des cellules de neuroblastomes humains de type SH-SY5Y. Ses actions neuroprotectrices sont similaires à celles induites par le peptide natif. Cependant, contrairement au PACAP, l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) est résistant à l'activité de la dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) et s'avère donc relativement stable métaboliquement. Lorsqu'injectés en iv à des souris traitées avec le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP), un précurseur métabolique du MPP⁺, le PACAP et l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) restaurent l'expression de la tyrosine hydroxylase au niveau de la substance noire et modulent la réponse inflammatoire. Bien que des chutes de la PAM soient observées avec les souris traitées avec les deux peptides, l'intensité de la diminution ainsi que sa durée sont significativement moins élevées avec l'analogue. En outre, aucun changement notable de la fréquence cardiaque n'est mesuré avec les animaux, et ce, tant pour le peptide natif que pour son dérivé. Par conséquent, l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) apparaît comme un gabarit moléculaire prometteur pour la conception d'analogues du PACAP potentiellement utiles pour le traitement curatif ou préventif de la MP, ou d'autres types de maladies neurodégénératives.

Contribution de l'étudiant

J'ai réalisé tout le travail ne concernant pas les expériences portant sur les tests d'AMPc, les tests de liaison et les mesures de dégradation des peptides par la DPP IV. La version initiale du manuscrit a été rédigée par moi-même avant d'être peaufinée par mes codirecteurs de thèse et mes collègues du laboratoire participant au projet. Ngoc Duc Doan a synthétisé le dérivé du PACAP. Myriam Létourneau a participé à cet article en réalisant les expériences portant sur la caractérisation pharmacologique du PACAP et de son analogue (test d'AMPc, test de liaison et la dégradation des peptides par la DPP IV). Julie Maucotel a complété l'expérimentation portant sur les mesures des paramètres cardiaques. Alain Couvineau a conçu les lignées cellulaires CHO transfectées avec les récepteurs du PACAP soit PAC1, VPAC1 et VPAC2. Hubert Vaudry a collaboré avec Alain Fournier et David Vaudry pour la conception du projet. Il a aussi révisé le manuscrit. David Chatenet a participé à l'élaboration des hypothèses et à réviser le manuscrit. Mes codirecteurs de thèse, David Vaudry et Alain Fournier ont conçu le projet, émis les hypothèses, supervisé mon travail avec le support de Myriam Létourneau et de David Chatenet, et révisé le manuscrit de manière à produire la version finale.

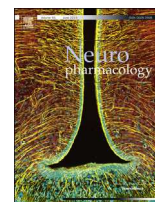
Au cours de cette étude notre travail a consisté en :

- La caractérisation pharmacologique de l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27), un analogue de synthèse du PACAP; ceci incluant, le test de production d'AMPc, les mesures de liaison et la susceptibilité des peptides à la dégradation par la DPP IV.
- L'étude de l'impact des modifications introduites au niveau de l'analogue sur des modèles de la MP ; ceci incluant des tests de survie cellulaire in vitro et in vivo, et des mesures des variations cardiovasculaires en présence du PACAP ou de son analogue.



Contents lists available at ScienceDirect

Neuropharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuropharm

Characterizations of a synthetic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide analog displaying potent neuroprotective activity and reduced *in vivo* cardiovascular side effects in a Parkinson's disease model

Q9

Q8

Asma Lamine^{a, b, c}, Myriam Létourneau^{a, b}, Ngoc Duc Doan^{a, b}, Julie Maucotel^{b, c},
Alain Couvineau^d, Hubert Vaudry^{b, c}, David Chatenet^{a, 1}, David Vaudry^{b, c, 1},
Alain Fournier^{a, b, *, 1}

Q1

^a INRS – Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada

^b Laboratoire International Associé Samuel de Champlain, Canada

^c INSERM-U982, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, IRIB, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

^d INSERM U1149/Inflammation Research Center (CRI), Université Paris-Diderot, Faculté de Médecine Site Bichat, 16, rue H. Huchard, 75018 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 February 2015

Received in revised form

7 May 2015

Accepted 12 May 2015

Available online xxx

Keywords:

Neurodegeneration

Neurodegenerative disorders

PACAP

Dopaminergic neuron survival

SH-SY5Y neuroblastoma cell survival

Vasodilatation

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is characterized by a steady loss of dopamine neurons through apoptotic, inflammatory and oxidative stress processes. In that line of view, the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), with its ability to cross the blood–brain barrier and its anti-apoptotic, anti-inflammatory and anti-oxidative properties, has proven to offer potent neuroprotection in various PD models. Nonetheless, its peripheral actions, paired with low metabolic stability, hampered its clinical use. We have developed Ac-[Phe(*pl*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) as an improved PACAP-derived neuroprotective compound. *In vitro*, this analog stimulated cAMP production, maintained mitochondrial potential and protected SH-SY5Y neuroblastoma cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) toxicity, as potently as PACAP. Furthermore, contrasting with PACAP, it is stable in human plasma and against dipeptidyl peptidase IV activity. When injected intravenously to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice, PACAP and Ac-[Phe(*pl*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) restored tyrosine hydroxylase expression into the *substantia nigra* and modulated the inflammatory response. Albeit falls of mean arterial pressure (MAP) were observed with both PACAP- and Ac-[Phe(*pl*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27)-treated mice, the intensity of the decrease as well as its duration were significantly less marked after iv injections of the analog than after those of the native polypeptide. Moreover, no significant changes in heart rate were measured with the animals for both compounds. Thus, Ac-[Phe(*pl*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) appears as a promising lead molecule for the development of PACAP-derived drugs potentially useful for the treatment of PD or other neurodegenerative diseases.

© 2015 Published by Elsevier Ltd.

Abbreviations: Cq, quantification cycle; Eu3, europium(III) cryptate; MPP⁺, 1-methyl-4-phenylpyridinium; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; MTP, mitochondrial transmembrane potential; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; NONO, Non-POU domain-containing octamer-binding protein; PAC1, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 receptor; PACAP27, 27-amino acid isoform of PACAP; PACAP38, 38-amino acid isoform of PACAP; PFA, paraformaldehyde; Phe(*pl*), *para*-iodo-L-phenylalanine; PTS-6, peptide transport system-6; SN, *substantia nigra*; SNpc, *substantia nigra pars compacta*; TBST, Tris-buffered saline with Tween 20; TH, tyrosine hydroxylase; VIP, vasoactive intestinal peptide; VPAC1, VIP/PACAP type 1 receptor; VPAC2, VIP/PACAP type 2 receptor.

* Corresponding author. Institut national de la recherche scientifique, INRS – IAF, 531 boul. des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada. Tel.: +1 450 687 5010x8816.

E-mail address: alain.fournier@iaf.inrs.ca (A. Fournier).

¹ Co-senior authors.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.014>

0028-3908/© 2015 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder that causes significant disability and death. Parkinson patients exhibit behavioral and cognitive syndromes due to a progressive degeneration of dopamine neurons in the *substantia nigra* (SN) (Chan-Palay, 1991). Currently, all proposed therapies are only palliative and there is no cure (Athauda and Foltynie, 2015). Many studies showed that neurodegeneration is characterized by apoptotic cell death caused in part by an inflammatory process and an elevation of oxidative stress (Emerit et al., 2004; Friedlander, 2003; Wilms et al., 2007). Hence, some neuroprotective treatments and modulators of inflammation were developed and a few were even tested clinically (Athauda and Foltynie, 2015). However, the results remained unsatisfactory due in part to the molecular selectivity of the blood–brain barrier (BBB), which prevented the crossing of most drugs investigated for the treatment of this disease, or because they only targeted one aspect of the disease. In this context, the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a promising molecule for the development of a therapeutic strategy to cure a neurodegenerative disease such as PD, because it crosses the BBB and exhibits anti-apoptotic, anti-inflammatory and anti-oxidant activities (Nishimoto et al., 2007; Ravni et al., 2006; Reglodi et al., 2004a; Shioda et al., 2006). Indeed, PACAP has been shown to exert neuroprotective effects in experimental models of neurodegeneration, cerebral ischemia and brain injuries (Deguil et al., 2007; Lazarovici et al., 2012; Lee and Seo, 2014; Rat et al., 2011; Reglodi et al., 2011; Tamas et al., 2012). In particular, through its various actions including the modulation of brain dopaminergic and cholinergic neurotransmission pathways, this peptide appeared as a potent neuroprotective molecule in models of PD (Brown et al., 2013, 2014; Reglodi et al., 2004b; Shivers et al., 2014; Wang et al., 2008). Nevertheless, there are some limitations for the use of PACAP in clinic. For instance, it exhibits a low stability in human plasma with a half-life <5 min (Bourgault et al., 2008a). In fact, PACAP is prompted to rapid degradation by dipeptidyl peptidase IV (DPP IV), an enzyme that converts PACAP38 into PACAP(3–38) and then PACAP(5–38), two fragments that behave as antagonists. Another limitation is that it also exerts peripheral actions (Farnham et al., 2011; Warren et al., 1992). Particularly, using pharmacological tools and transgenic animals, it was demonstrated that three distinct G protein-coupled receptors *i.e.* PAC1, VPAC1 and VPAC2 mediate the effects of PACAP (Vaudry et al., 2009, 2000). The anti-apoptotic actions mainly rely on the PAC1 receptor, while the anti-inflammatory activities are mostly mediated through VPAC1 (Delgado et al., 2002; Kellogg et al., 2012; Vaudry et al., 2002). However, VPAC2 stimulation produces particular actions such as vasodilation, tachycardia and water retention (Farnham et al., 2011; Tsutsumi et al., 2002; Warren et al., 1992), and those effects would limit its use as a neuroprotective drug. Therefore, a PACAP derivative with an improved metabolic stability and the capacity to activate the PAC1 (anti-apoptotic) receptor, or simultaneously the PAC1 and VPAC1 (anti-inflammatory) receptors, without stimulating VPAC2, would be of great interest. Previous structure–activity relationship (SAR) studies showed that the biological activity and selectivity of PACAP are dependent on the molecular structure adopted by the N-terminal segment of the molecule (Bourgault et al., 2009b; Doan et al., 2011; Gourlet et al., 1995). Also, the determinants linked to the biological activity and selectivity of PACAP towards its receptors were also documented by the antagonism observed with PACAP fragments (Robberecht et al., 1992), as well as by various analogs depicted throughout SAR studies (Bourgault et al., 2008b, 2009a, 2009b; Doan et al., 2011; Ramos-Alvarez et al., 2015). More precisely, residues His¹, Asp³ and Phe⁶ have been pointed out as key

amino acids for a suitable N-terminal peptide conformation that would yield high affinity and potent biological activity.

Hence, PACAP represents an excellent molecular template for the development of a therapeutic approach aiming at slowing or even stopping the neuronal death occurring during brain diseases. In this context, based on SAR studies, we designed a PACAP analog in which an acetyl group was attached to the amino-terminal function to enhance stability (Bourgault et al., 2008a). In addition, the methionine residue in position 17 was substituted with its norleucine isostere to avoid peptide oxidation. Those two modifications do not affect the biological activity (Bourgault et al., 2009a). Finally, because hydrophobicity and steric hindrance at position 6 were identified as key features (Bourgault et al., 2009b), a bulky iodine atom was introduced on the *para* carbon of the aromatic ring of Phe⁶. In the present study, using binding assays with cell lines stably transfected with the PAC1, VPAC1 and VPAC2 receptors, respectively, we investigated the selectivity of Ac-[Phe(*p*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1–27) towards the PACAP receptors. In addition, we evaluated the protective effect of the analog against the neurotoxicity produced *in vitro* by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) and *in vivo* by its precursor 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Finally, we compared the effect of Ac-[Phe(*p*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1–27) with that of native PACAP on mean arterial pressure and heart rate.

2. Materials and methods

2.1. Peptide synthesis and purification

All peptides were synthesized using Fmoc-based solid phase synthesis, following a protocol previously published (Bourgault et al., 2009b). The derivative Fmoc-Phe(*p*)-OH (ChemImpex, Wood Dale, IL, USA) was introduced in the peptide chain to generate Ac-[Phe(*p*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1–27). Once released from the Rink-AM resin through a trifluoroacetic acid (TFA) cleavage, peptides were purified by preparative reverse phase HPLC to attain a minimum of 95% purity, and their molecular weight was verified by MALDI-TOF mass spectrometry. Pure peptides were lyophilized and kept at –20 °C until use.

2.2. Cell culture

Transfected CHO cells stably expressing the human PAC1, VPAC1 or VPAC2 receptor were grown in Ham's F12 medium containing 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 UI/mL each of penicillin and streptomycin and 400 µg/mL of G418. The SH-SY5Y cells, which are a human neuroblastoma cell line stably expressing constitutively the PAC1 and VPAC2 receptors but not VPAC1 (Lutz et al., 2006), were cultured in a 1:1 mixture of Ham's F12 Nutrient mixture and MEM medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 UI/mL each of penicillin and streptomycin, and 15% FBS. All cell lines were maintained as a monolayer at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air and cell passages were performed by trypsinization when cells were at 80% confluence.

2.3. Binding assay

CHO transfected cells expressing the human PAC1, VPAC1 or VPAC2 receptor were used to perform binding assays with [¹²⁵I]-Ac-PACAP27 as the tracer. The detailed procedure to perform the assay was previously published (Doan et al., 2011).

2.4. cAMP assay

Production of cAMP was assessed on SH-SY5Y cells using the cAMP dynamic 2 assay kit from CisBio (Bedford, MA, USA), in accordance with the manufacturer's protocol. Cells were harvested by trypsinization, centrifuged and dispersed in PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) containing 2 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (Sigma–Aldrich, Oakville, CAN) at a concentration of 800 cells/µL. In a 384-well plate, a volume of 5 µL of peptide solution at the desired concentration was placed in each well and cAMP production was initiated by the addition of cells (5 µL/well). After 30 min of incubation at room temperature (RT), the reaction was stopped by the addition (5 µL/well) of the cAMP-d2 conjugate in lysis buffer. The anti-cAMP-Eu3-cryptate antibody was finally added and the plate was read on a FlexStation 3 (Molecular Devices, CA, USA) after 1 h of incubation at RT. Values from the 665 nm/620 nm ratio were used to determine the concentration of cAMP released from the cells after exposure to stimulators, in function of a cAMP standard curve produced using the same incubation protocol. Results were expressed as a percentage of cAMP production, with 1 mM forskolin stimulation

considered as 100%. Results were plotted as mean \pm SEM and represent at least 4 independent assays performed in duplicate.

2.5. Dipeptidyl peptidase IV stability assay

Stability of peptides towards DPP IV cleavage was assessed based on a protocol previously published (Bourgault et al., 2008b). Briefly, peptides (500 μ L, 10^{-5} M) were incubated at various times with pure DPP IV (Sigma–Aldrich, Oakville, CAN), and then aqueous TFA (3%; 100 μ L) was added to stop the reaction. The enzymatic cleavage was monitored by MALDI-TOF mass spectrometry and reverse phase HPLC. Results from 3 independent assays were expressed as a relative HPLC purity determined as the ratio of purity at different incubation times over the initial value obtained with undigested controls.

2.6. Survival assay

SH-SY5Y cells were seeded into 96-well plates at a density of 3×10^4 cells/well and incubated 48 h to ensure cell adhesion. Cells were treated for 4 h with peptides (100 nM final concentration) and then incubated with MPP⁺ (1.5 mM final concentration) for 24 h at 37 °C. Concentrations used were chosen according to Doan et al. (2011). All experiments were performed in a serum-free medium. Cell viability was assessed 24 h after MPP⁺ treatment by using a MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) assay kit (Promega, WI, USA) compatible with a microplate reader (MTXTC Revelation, Dynex Tech, VA, USA) to determine the optical density related to the conversion of MTS into purple-colored water-soluble formazan.

2.7. Mitochondrial transmembrane potential (MTP) assay

Change of MTP was measured using the fluorescent probe JC-1 (Life Technologies, Burlington, CAN). Aggregations of the JC-1 probe on intact mitochondria produce an orange–red fluorescent staining that is indicative of a normal MTP. Upon depolarization of the mitochondrial membrane, the orange–red punctate staining is replaced by diffuse green monomer fluorescence. Hence, SH-SY5Y cells were treated as described above for the survival assay and then incubated for 15 min, at 37 °C, with the JC-1 probe (10 μ g/mL). Following two washes with PBS, proportion of aggregated versus monomeric JC-1 probe was quantified by measuring the ratio of fluorescence emissions at 590 nm (orange–red) over 530 nm (green) with a SpectraMax M Series multi-mode microplate reader using the SoftMax Pro Software (Molecular Devices, CA, USA).

2.8. Animals

Ten-week-old male C57Bl/6 mice were used for this study. Animals were obtained from Charles Rivers Laboratories (L'Arbresle, FR) and acclimatized for 1 week in the animal facility, in controlled temperature and lighting conditions (23 ± 1 °C, light on from 8 a.m. to 8 p.m.) with free access to food and water. Experiments were performed in accordance to ethical and legal aspects of animal experimentation (Act 2001-464 of the French Department of Agriculture) and following the European guidelines for the use of laboratory animals (86/609/EEC).

2.9. In vivo neuroprotection assessment

This set of experiments was similar to that performed by Deguil et al. (2010). Six groups of mice were formed: Control ($n = 10$), MPTP ($n = 12$), PACAP ($n = 12$), Analog ($n = 12$), MPTP plus PACAP ($n = 12$) and MPTP plus Analog ($n = 12$). Each day and during five consecutive days (D1–D5), animals received 2 different injections: a 100 μ L intraperitoneal (ip) injection of MPTP (30 mg/kg/day) and then 1 h later a 100 μ L intravenous (iv) injection of 3.5 nmol/kg/day of peptide, i.e. 15.7 μ g/kg/day of PACAP38 and 11.4 μ g/kg/day of Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27). Whenever a compound was not given, a saline injection of the same volume was performed. On D5, 3 to 5 animals per group were sacrificed and tissues subjected to RT-qPCR quantification. Remaining mice from each group were used for the Western blot and immunohistochemistry experiments, and animals were sacrificed 3 days after the last injection, i.e. D-8.

2.10. Immunohistochemistry

Three to four animals from each group were anaesthetized with pentobarbital (Sigma–Aldrich, Lyon, FR; 40 mg/kg body weight ip) and an intracardiac saline perfusion was performed to evacuate blood. Then, animals were perfused with a 4% paraformaldehyde (PFA) solution (Sigma–Aldrich, Lyon, FR) prepared in PBS for prefixation. Animals were decapitated and the brain was removed and incubated overnight at 4 °C in a 4% PFA solution. Two consecutive 24 h treatments in 15% and 30% sucrose/PBS solutions, respectively, prepared the brains for cryopreservation before being stored in Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek, Villeneuve d'Ascq, FR) at -80 °C until use. Brain sections were cut with a cryostat (Leica CM3050; Leica Microsystems, Nanterre, FR), and mounted onto gelatin-coated glass slides. Sections were first treated with donkey serum for 90 min at RT and then incubated overnight at 4 °C with an anti-tyrosine hydroxylase (TH) rabbit primary antibody (1:500 dilution; Millipore, Molsheim, FR) followed by a second incubation with an Alexa-Fluor 488[®]-conjugated donkey anti-rabbit antibody (Invitrogen™ Life technologies,

Longjumeau, FR). Images were acquired using a Leica TCS SP2 upright confocal laser-scanning microscope (Leica Microsystems, Nanterre, FR).

2.11. Mice brain preparations and Western blot

Substantia nigra tissues obtained from brains of each group were placed in 1 mL of lysis buffer (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, and Pierce™ EDTA free protease inhibitor tablets; Thermo Scientific, Paris, FR). The resulting lysates were normalized for total protein content using the Bradford reagent. Protein samples (20 μ g) were subjected to 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), transferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham, Les Ulis, FR), blocked for 1 h at RT in a blocking solution composed of 5% skim milk in 50 mM Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBST), and then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies against TH (1:1000 dilution; Millipore, Molsheim, FR) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 1:4000 dilution; Santa Cruz, Nanterre, FR) prepared in the same blocking solution. Afterwards, membranes were washed with TBST and then incubated 1 h at RT, in TBS containing 5% skim milk, with a goat-anti-rabbit (1:10⁴ dilution; Santa Cruz, Nanterre, FR) conjugated to horseradish peroxidase. After washings with TBST, proteins were visualized with a chemiluminescence detection kit (ECL System, GE Healthcare, Aulnay-sous-Bois, FR). Measurements of the signal intensity were performed using an image analysis system (BioRad, Châtillon, FR).

2.12. In vivo blood pressure and heart rate measurements

Mice were anaesthetized by inhalation of 5% isoflurane and maintained sedated with a 2% mixture of this anaesthetic. Then, one catheter was introduced in the tail vein and a second one was inserted into the femoral artery of the right hind leg. The vein catheter was used for injections of peptides or saline, whereas the artery cannula was attached to a blood pressure (BP) transducer connected to a PowerLab multi-purpose data acquisition system (ADInstruments, Oxford, UK). After a stabilization period of time (20 min), doses of PACAP or its analog, dissolved in 100 μ L of saline, were given to the animals ($n = 7$ mice for each dose). The same amount of nmoles of both peptides was injected to the mice and the cannula was rinsed with saline after peptide administrations. The next injection was given when the MAP was back to a steady value. Data of mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR) were collected every second. On the one hand, to assess simultaneously the MAP fall and its duration, the area above the pressure recording curve, i.e. the summation of MAP differences with the basal value at each sec, was calculated during the interval between the injection and the return to a steady BP. On the other hand, the mean HRs were measured during 10 s before the injection, and also during 10 s at the blood pressure nadir. Mice received 1.75 nmol/kg, 3.5 nmol/kg, and 7 nmol/kg doses of PACAP or Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27), which corresponded to 7.85 μ g/kg, 15.7 μ g/kg and 31.4 μ g/kg of PACAP, and to 5.71 μ g/kg, 11.42 μ g/kg and 22.84 μ g/kg of Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27), respectively.

2.13. Real-time PCR analysis

Total RNA from *substantia nigra* was extracted using Tri-Reagent (Sigma–Aldrich, Lyon, FR) and purified with the NucleoSpin RNA II kit (Macherey–Nagel, Hoerd, FR). After elution, the RNA concentration was measured using a Thermo Scientific NanoDrop 2000 spectrophotometer (Labtech, Palaiseau, FR) at an absorbance of 260 nm. Then, reverse transcription was performed with the Improm-II Reverse Transcription Kit (Promega, Lyon, FR) to obtain complementary DNA (cDNA). Real-time PCR amplifications were performed on a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, FR) using a Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies, Paris, FR) with 5 ng cDNA and 300 nM of the following primers: caspase 3 forward 5'GAG GCT GAC TTC CTG TAT GCT T 3' and reverse 5'AAC CAC GAC CCG TCC TTT 3', TNF- α forward 5'GAC CCT CAC ACT CAG ATC ATC TTC T3' and reverse 5'CCA CTT GGT GGT TTG CTA CGA 3', IL-6 forward 5'CCA ACA GAC CTG TCT ATA CCA CTT CA3' and reverse 5'TGC ACA ACT CTT TTC TCA TTT CCA 3'. The level of target gene expression was calculated using the comparative quantification cycle (Cq) method and expressed as $2^{-\Delta\Delta Cq}$. The Non-POU domain-containing octamer-binding protein (NONO) was used as the housekeeping gene with 5'TTA GTG AGG ACT GCG AGG CA 3' and 5'TTC TGC TTC TCC AAG TTA AAG GCT 3' as forward and reverse primers, respectively.

2.14. Statistical analysis

All data are from 3 to 7 independent experiments. Data were analyzed using the Prism software (Graphpad Software, CA, USA) and expressed as mean \pm SEM. Statistical evaluation of the results was performed by ANOVA followed by a Bonferroni's test, except results obtained with arterial blood pressure and heart rate measurements, which were analyzed using an unpaired Student's *t* test. Results were considered significant with $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Pharmacological characterization

Binding assays performed on CHO cells expressing the human PAC1, VPAC1 or VPAC2 receptor revealed that modifications introduced in Ac-[Phe(*pI*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) resulted in a loss of affinity towards all PACAP receptors, with IC₅₀ values of 2.9×10^{-7} M, 3.0×10^{-7} M and 9.5×10^{-7} M for PAC1, VPAC1 and VPAC2, respectively. In the same receptor assays, the IC₅₀ for PACAP38 and PACAP27 are given in Table 1. When the results obtained with the analog are compared to those of the native 27- or 38-amino acid PACAP isoforms, it is observed that the relative decrease of affinity is much larger with VPAC1 and VPAC2 than with PAC1 (Table 1). Moreover, when standardized to PAC1, the data show that the affinity for VPAC1 and VPAC2 is almost twice more affected when compared to PACAP27, and approximately 4-fold more altered when compared to PACAP38.

The binding variations observed with the peptides for the PAC1 receptor also led to differences in their potency to stimulate cAMP production in SH-SY5Y cells (Fig. 1). However, although Ac-[Phe(*pI*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) was a weaker agonist than PACAP38 and PACAP27, at a same concentration, its activity was between 60% and 70% that of the 38- and 27-residue isoform peptides. Interestingly, vasoactive intestinal peptide (VIP) was unable to generate cAMP from SH-SY5Y cells although this neuroblastoma cell line was previously described to constitutively express PAC1 and VPAC2 receptors (Lutz et al., 2006).

3.2. Stability assessment

It is known that PACAP is prone to enzymatic degradation through the action of a few peptidases, and especially DPP IV. Indeed, a previous study highlighted that PACAP38 was rapidly degraded in the presence of DPP IV or in human plasma, whereas PACAP27 possessed a high stability in plasma (Bourgault et al., 2008a). As expected, Ac-[Phe(*pI*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) showed no sign of degradation in human plasma even after 2 h of incubation at 37 °C (results not shown). Moreover, when incubated in the presence of pure DPP IV, the analog proved to resist to degradation for at least 2 h while PACAP27, under the same experimental conditions, already began to be metabolized after 15 min (Fig. 2).

3.3. In vitro neuroprotection evaluation

The effect of PACAP38, PACAP27 and Ac-[Phe(*pI*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) on the neurotoxicity caused *in vitro* by MPP⁺ was evaluated using the MTS assay and the JC-1 probe. On the one hand, it was observed that a 24 h treatment of SH-SY5Y cells with 1.5 mM

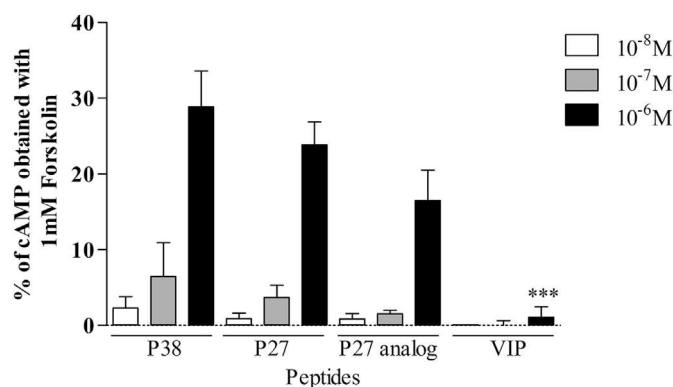


Fig. 1. cAMP responses evaluated on SH-SY5Y cells with PACAP38 (P38), PACAP27 (P27), Ac-[Phe(*pI*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) (P27 analog) or VIP at 3 different concentrations using the cAMP dynamic 2 kit from Cisbio. Data are expressed as the percentage of the response induced during the same assay by 1 mM forskolin. Data represent mean \pm SEM of at least 4 independent assays performed in duplicate. An ANOVA analysis was conducted using a Bonferroni's post-test to determine statistical differences between P38 responses at each concentration and those obtained at the same concentration with P27, P27 analog or VIP. *** represents $P < 0.001$.

MPP⁺ led to 50% of cell death (Fig. 3A). On the other hand, a 4 h incubation with PACAP38, PACAP27 or Ac-[Phe(*pI*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27), prior to the MPP⁺ treatment, was able to protect the SH-SY5Y cells against MPP⁺ neurotoxicity. In fact, at the concentration used (100 nM), PACAP38 and Ac-[Phe(*pI*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) were able to reduce MPP⁺-evoked cell death by 40–45%, whereas PACAP27 was slightly weaker. Thus, the three PACAP-derived compounds counteracted the MPP⁺ toxicity, whereas VIP failed to exert a similar effect. Because the toxicity of MPP⁺ originates from its ability to permeabilize the mitochondria outer membrane, we examined the ability of both PACAP isoforms and Ac-[Phe(*pI*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) to maintain the mitochondrial transmembrane potential using the ratiometric fluorescent probe JC-1. In accordance with the results of the MTS assay, a treatment of SH-SY5Y cells with 1.5 mM MPP⁺ for 24 h induced a significant reduction (~50%) in the 590 nm/530 nm ratio in comparison to control conditions, indicating that the mitochondrial integrity was severely altered by the MPP⁺ treatment (Fig. 3B). PACAP38, PACAP27 and Ac-[Phe(*pI*)⁶, Nle¹⁷]PACAP27, per se, had no effects on the 590/530 nm fluorescence ratio (data not shown), but they significantly reduced the deleterious action of MPP⁺ on the mitochondrial transmembrane potential (Fig. 3B). Moreover, the neuroprotective effect observed with PACAP38 and Ac-[Phe(*pI*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) was higher than that obtained with PACAP27. Consequently, only PACAP38 and Ac-[Phe(*pI*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) were used for all subsequent experiments.

Table 1

Pharmacological characterization of PACAP38, PACAP27 and Ac-[Phe(*pI*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) using competitive binding assays.

	IC ₅₀ values ^a [M] (95% confidence intervals)			Ratio of IC ₅₀ values		Fold change compared to PAC1 ^b	
	PACAP38	PACAP27	Analog	Analog/PACAP38	Analog/PACAP27		
PAC1	6.9×10^{-9} (2.9×10^{-9} to 1.7×10^{-8})	1.4×10^{-8} (6.6×10^{-9} to 3.1×10^{-8})	2.9×10^{-7} (1.9×10^{-7} to 4.5×10^{-7})	(A)	(A')	(A/A)	(A'/A')
VPAC1	1.8×10^{-9} (6.3×10^{-10} to 5.2×10^{-9})	8.8×10^{-9} (1.7×10^{-9} to 4.5×10^{-8})	3.0×10^{-7} (2.2×10^{-7} to 4.4×10^{-7})	(B)	(B')	(B/A)	(B'/A')
VPAC2	5.9×10^{-9} (2.4×10^{-9} to 1.5×10^{-8})	2.5×10^{-8} (1.3×10^{-8} to 4.8×10^{-8})	9.5×10^{-7} (3.6×10^{-7} to 2.5×10^{-6})	(C)	(C')	(C/A)	(C'/A')
				161	38	3.83	1.81

^a Half maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) of PACAP38, PACAP27 and Ac-[Phe(*pI*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) obtained with displacement experiments carried out with [¹²⁵I]-Ac-PACAP27 and CHO transfected cells expressing either the PAC1, VPAC1 or VPAC2 receptor.

^b Fold change of the IC₅₀ value ratios compared with those obtained with PAC1.

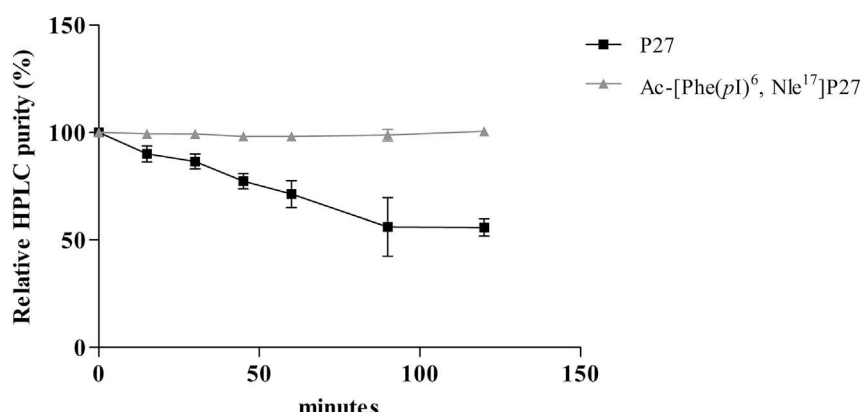


Fig. 2. Degradation kinetics of PACAP27 (P27, black squares) and Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]P(1-27) (gray triangles) by dipeptidyl peptidase IV (DPP IV). Peptides (10⁻⁵ M) were incubated in the presence of 10 mU of pure DPP IV and aliquots were analyzed by RP-HPLC after different incubation times. Results represent the ratio between HPLC purity of the peptide after incubation with DPP IV and undigested controls (0 min), expressed as percentages. Data are the mean ± SEM of 3 independent assays performed in duplicate.

3.4. *In vivo* neuroprotection evaluation

A decrease of TH expression in dopaminergic (DA) neurons within the SN is a hallmark sign of PD. Thus, following our *in vivo* experimental protocol, we performed an immunohistochemistry evaluation of TH expression in SN *pars compacta* (SNpc) DA neurons. PACAP38 and Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27)-treated animals exhibited a TH pattern similar to that of sham mice (results not shown) but, as expected, TH staining was markedly reduced in the SNpc of mice that had received an MPTP injection, as compared

to samples from sham animals (Fig. 4A). However, TH immunostaining in MPTP-treated mice that had received an iv injection of PACAP38 or Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) was more pronounced than that of the MPTP group, thereby suggesting that these peptides were protecting DA neurons of the SN against MPTP-induced neuronal death. Moreover, densitometric analysis of whole brain TH expression showed that TH depletion was significantly reduced in brains of animals treated with MPTP and PACAP38 or Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27), when compared to those treated with MPTP alone (Fig. 4B).

3.5. Expression of inflammation and apoptosis markers

Inflammation is an important factor in the development of PD. Hence, in a PD mouse model, we evaluated the impact of PACAP38 and Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) on cytokines associated with inflammation. Thus, mRNA expression levels were evaluated for IL-6 and TNF- α through RT-qPCR on SN samples of animals from all groups (Fig. 5A and B). The mRNA levels of caspase 3 were also evaluated (Fig. 5C) because this enzyme is a key component of the apoptotic process that takes place during the disease. The results showed that the MPTP treatment significantly increased IL-6, TNF- α and caspase 3 expression levels, whereas PACAP38 and Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) injections significantly down-regulated the expression of those genes in MPTP-treated mice.

3.6. *In vivo* cardiovascular effects evaluation

In the course of the *in vivo* experimental protocol, peptides were injected intravenously, thereby favoring possible peripheral biological activities. Three doses were used for each peptide *i.e.* 7.85, 15.7 and 31.4 μ g/kg for PACAP38, and 5.71, 11.42 and 22.84 μ g/kg for Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27). Those doses are equivalent to 1.75, 3.5 and 7 nmol/kg, respectively, and they correspond to 0.5 \times , 1 \times and 2 \times the dose used for the *in vivo* neuroprotection evaluation. Among the listed PACAP actions, vasorelaxation and tachycardia are well documented (Vaudry et al., 2009). Thus, MAP and HR were monitored right after PACAP38 or Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) injections. In control conditions, MAP remained steady at around 80 mmHg, and the mean HR was recorded at *ca.* 320 beats/min. However, following injections of peptides, MAP decreased at all three doses compared to that of the basal level, according to a dose-response pattern (Fig. 6A, B and C). Administration of PACAP38 caused slightly stronger decreases of MAP than Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27). Also, it was observed that the effect of

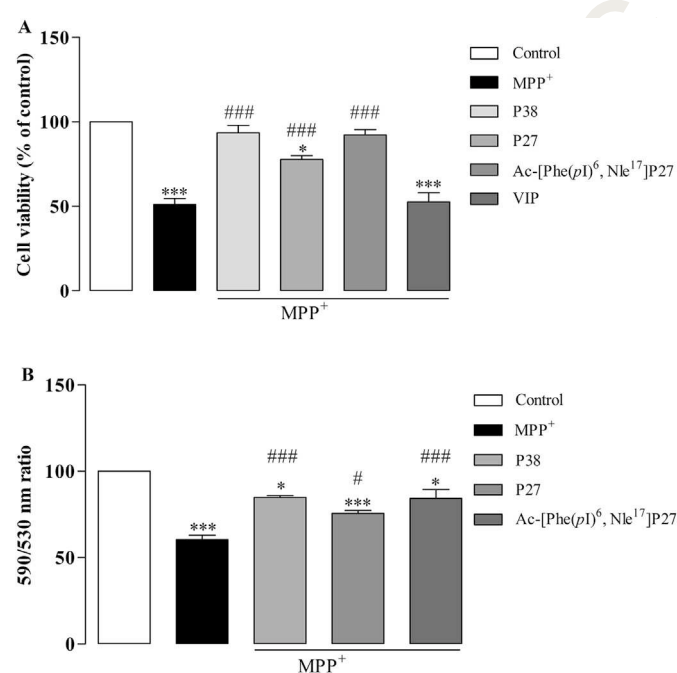


Fig. 3. Effect of PACAP and related analogs on viability of SH-SY5Y cells (P38:PACAP38; P27:PACAP27). (A) Effect of MPP⁺ (1.5 mM) following a 4 h pre-treatment with peptides (100 nM) on SH-SY5Y cell survival assessed by MTS assay. (B) Effect of pre-treatment (4 h) of PACAP or its related compounds (100 nM) on MPP⁺-induced alteration of mitochondrial membrane potential in SH-SY5Y cells. Mitochondrial transmembrane potential was assessed using the JC-1 probe through the 590 nm/530 nm fluorescence emission ratio serving as the indicator. Values represent the mean ± SEM of at least 4 independent experiments performed in sextuplicate. Statistical analyses were carried out using an ANOVA followed by the Bonferroni's test (**P* < 0.05 and ****P* < 0.001 vs. control; #*P* < 0.05 and ###*P* < 0.001 vs. MPP⁺-treated cells).

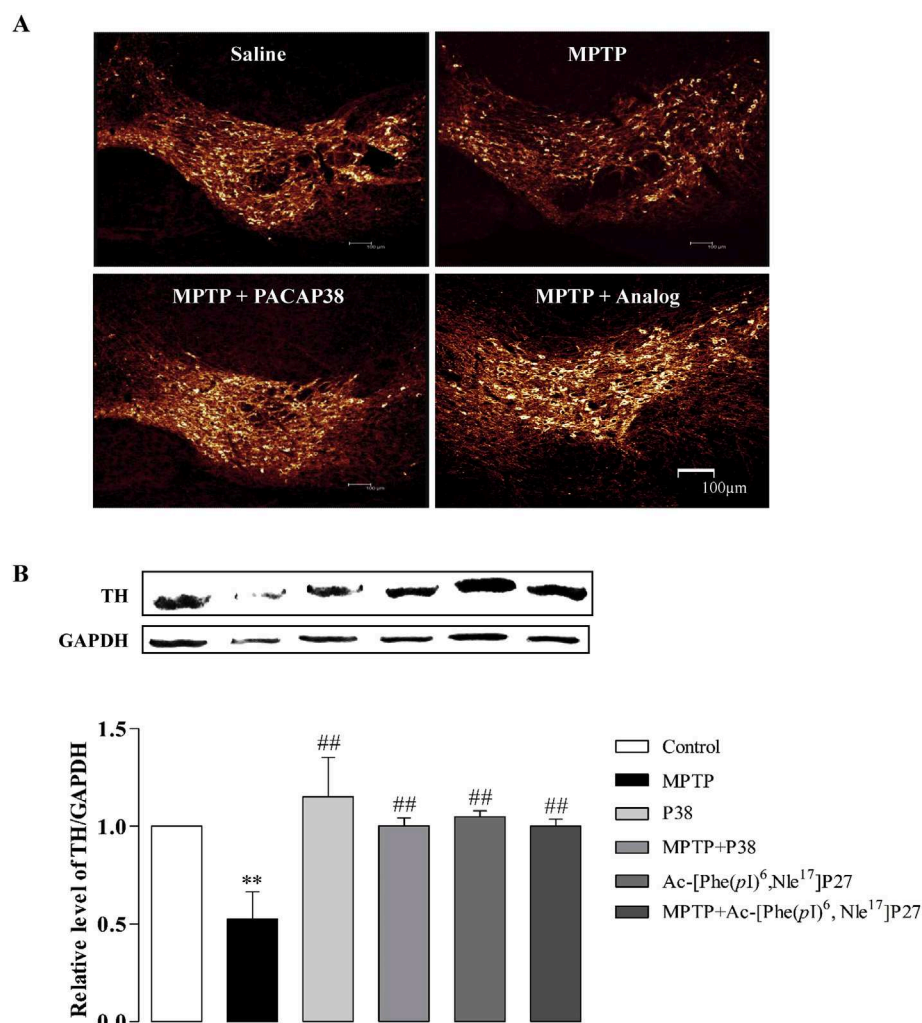


Fig. 4. (A) Neuroprotective effect of PACAP38 and Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) on TH expression in *substantia nigra pars compacta* (SNpc) of MPTP-treated mice. TH expression was decreased significantly in the SNpc of MPTP-treated mice compared to control. Both peptides rescued TH expression that was reduced upon MPTP treatment. Scale bar = 100 μ m. (B) Densitometric analysis of TH protein expression in the SNpc of control, MPTP-, PACAP38-, MPTP + PACAP38-, Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27)-, and MPTP + Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27)-treated mice. For TH protein expression analysis, values represent the relative optical density (OD) after normalization to GAPDH. All values are expressed as mean \pm SEM of at least 4 independent experiments. As determined through ANOVA analysis followed by a Bonferroni's test, ** P < 0.01 is statistically significant compared to untreated animals; ## P < 0.01 is statistically significant compared to MPTP-treated animals.

PACAP38 was to some extent longer than that of the analog. Therefore, to assess simultaneously the MAP fall and its duration, the area above the pressure-recording curve was calculated during the interval between the start of the hypotension and the return to a steady BP. As depicted in Fig. 6A, B and C, significant differences between PACAP38 and Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) were measured for the three doses, demonstrating that the analog at a same dose exhibits lower vascular actions in comparison to the native peptide. Moreover, MAP fall durations are displayed in Fig. 6D, E and F, and they confirmed the significant changes between the time spans for the effect of the native peptide and its analog. Worth to mention, at the doses injected, neither PACAP38 nor the analog induced a significant change in heart rate (results not shown).

4. Discussion

The SH-SY5Y neuroblastoma cells express tyrosine hydroxylase and the dopamine transporter, thereby exhibiting dopaminergic neuron characteristics (Martins Lopes et al., 2010; Presgraves et al.,

2004; Xie et al., 2010). Thus, this cell line, widely used as an *in vitro* model of Parkinson's disease, was utilized to investigate the neuroprotective effects of PACAP and its analog. The study showed that a 4 h pretreatment with PACAP38, PACAP27 or Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) significantly protected SH-SY5Y neuroblastoma cells against MPP⁺-induced neurotoxicity. In contrast, VIP was unable to achieve this protection, suggesting that PAC1 was involved as SH-SY5Y cells express both the PAC1 and VPAC2 receptors. Moreover, diverging from reported results, VIP was also unable to induce cAMP production in this cell model. Indeed, Lutz et al. (2006) demonstrated that SH-SY5Y cells can produce cAMP in presence of VIP and they concluded that the effect was mediated by PAC1. However, they also showed that the intensity of cAMP production by VIP was related to the type of PAC1 receptor splice variants expressed in the cells. Nonetheless, our observations are in agreement with the results of Deguil et al. (2007) who demonstrated that PACAP, but not VIP, protected Neuro 2a cells, a mouse neuroblastoma cell line, from the MPP⁺-induced alteration of translational control. They also corroborate the data of previous studies showing that neuroprotection induced by PACAP takes place through PAC1

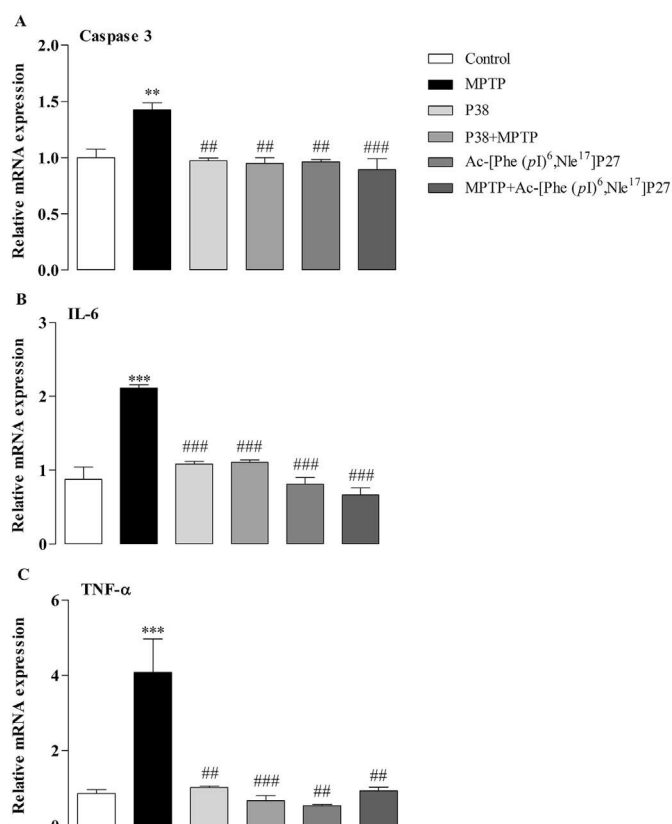


Fig. 5. Effect of PACAP38 and Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1–27) on the upregulation of caspase 3 (A), IL-6 (B) and TNF- α (C) in SNpc observed after an MPTP treatment. Values represent the caspase 3, IL-6 or TNF- α mRNA fold changes compared to NONO expression. All values are expressed as mean \pm SEM of at least 4 independent experiments. As determined through ANOVA analysis followed by a Bonferroni's test, *** P < 0.01 and **** P < 0.001 are statistically significant compared to untreated animals, whereas ## P < 0.01 and ### P < 0.001 are statistically significant compared to MPTP-treated animals.

activation and its downstream signaling cascade involving cAMP production and PKA activation (Lutz et al., 2006; Seaborn et al., 2011). Some studies have highlighted a protective effect of VIP against neurodegeneration, which would involve activation of the VPAC1 receptor (Delgado and Ganea, 2003). However, it appears that this action would come from immunomodulatory properties involving cAMP-dependent and cAMP-independent pathways that are associated with inhibition of pro-inflammatory cytokines and regulation of chemotaxis (Waschek, 2013) in macrophages and microglial cells.

During the pathogenesis of PD, mitochondria have been pointed out as key cell components because their dysfunction contributes to the evolution of the neurodegenerative disease. Furthermore, several studies suggested that this dysfunction could be an etio-pathogenesis factor of PD (Valadas et al., 2014). Thereupon, we have explored the capacity of the PACAP isoforms and the analog Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1–27) to inhibit the deleterious effects of MPP⁺ on mitochondrial membrane potential. In the current study, pretreatments with PACAP were used in the *in vitro* model to obtain information about the effectiveness of the peptides to prevent neuron apoptosis in conditions favoring neurodegeneration. As a matter of fact, it was previously shown that pre-treatments with PACAP, as well as co-treatments, were able to protect significantly SH-SY5Y cells against various neurotoxic agents, including MPP⁺ (Brown et al., 2013, 2014; Doan et al., 2011; Vaudry et al., 2009). Nevertheless, in the *in vivo* model, we investigated the effectiveness

of the peptides after MPTP administration to mice to explore PACAP neuroprotection at a later step of MPTP action. Various neurotoxic agents were used *in vivo* to reproduce PD including MPTP, rotenone, oxidopamine (6-OHDA) and paraquat (Blesa and Przedborski, 2014). From these toxic agents, MPTP administration is known to produce in humans, monkeys and mice a syndrome closely related to PD (Langston et al., 1984). Actually, subchronic administration of MPTP in animals was shown to induce a 50% loss of dopaminergic neurons along with movement disorders resembling those observed in PD patients (Deguil et al., 2010). In addition, MPTP induces neuronal death mechanisms, such as caspase 3 activation, upregulation of pro-inflammatory cytokines, presence of autophagic vacuoles, and occurrence of Lewy bodies, which are observed during the pathogenesis of PD (Bove et al., 2014; Pisanu et al., 2014). Accordingly, we observed that MPTP injections generated a loss of dopaminergic neurons, and an upregulation of caspase 3 and pro-inflammatory cytokines mRNA. Hence, these results are in agreement with those previously described (Bove et al., 2014; Pisanu et al., 2014) and emphasize the fact that administration of MPTP to animals generates a suitable *in vivo* model of PD. During the *in vitro* evaluation, PACAP38 appeared to be more effective than PACAP27 for neuroprotection. Thus, PACAP38 was used in the *in vivo* study as the positive control of neuroprotection. In fact, it has been demonstrated by various *in vivo* studies using for instance mice or rats that PACAP protects dopaminergic neurons against neuroinflammation and neurotoxicity induced by agents such as 6-OHDA and MPTP, and that it restores deregulated motor functions (Brown et al., 2013, 2014; Deguil et al., 2010; Lofrumento et al., 2014; Reglodi et al., 2004b, 2011; Shivers et al., 2014; Wang et al., 2008). Nevertheless, no accounts of *in vivo* neuroprotective effects with a synthetic PACAP-derived agonist have been reported so far using a PD model. Over the years, our group developed several PACAP-derived pharmacological tools to characterize the receptor domains. However, the properties of the analog Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1–27) suggested that it would be an excellent candidate for the design of potent *in vivo* neuroprotective compounds. Hence, although this analog had less affinity towards PAC1, VPAC1 and VPAC2 than PACAP38 and PACAP27, it appeared that the modifications introduced in the molecule were much more detrimental towards VPAC1 and VPAC2 than PAC1. Indeed, when expressed in comparison to those measured with PAC1, the binding data showed that the relative affinity decreased by almost 4-fold and 2-fold when compared to PACAP38 and PACAP27, respectively. Considering that the N-acetylation and substitution of Met¹⁷ with norleucine do not change the biological activity of PACAP (Bourgault et al., 2009a), the results support the hypothesis of a key role for the hydrophobicity of Phe⁶ (Bourgault et al., 2009b). Moreover, the effectiveness of the analog to produce cAMP was not much different from that of the native PACAP isoforms.

To prevent neuron cell death, a drug must cross the BBB. Previous studies have shown that PACAP38 crosses the BBB through a saturable process using the peptide transport system-6 (PTS-6), whereas PACAP27 crosses the BBB passively by a non-saturable process, and its accumulation in the CNS depends on its duration in blood circulation (Banks et al., 1993; Nonaka et al., 2005). It appears that Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1–27) crosses the BBB and stimulates cAMP production efficiently, as suggested by its ability to protect neurons when injected intravenously. Furthermore, its improved metabolic stability and perhaps, its enhanced hydrophobicity, most likely favor its delivery into the brain. As a matter of fact, the *in vivo* results demonstrated that Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1–27) was as potent as PACAP38 to counteract the deleterious effects of MPTP injected to C57BL/6 mice, as shown by the restoration of TH expression from DA neurons of the SNpc.

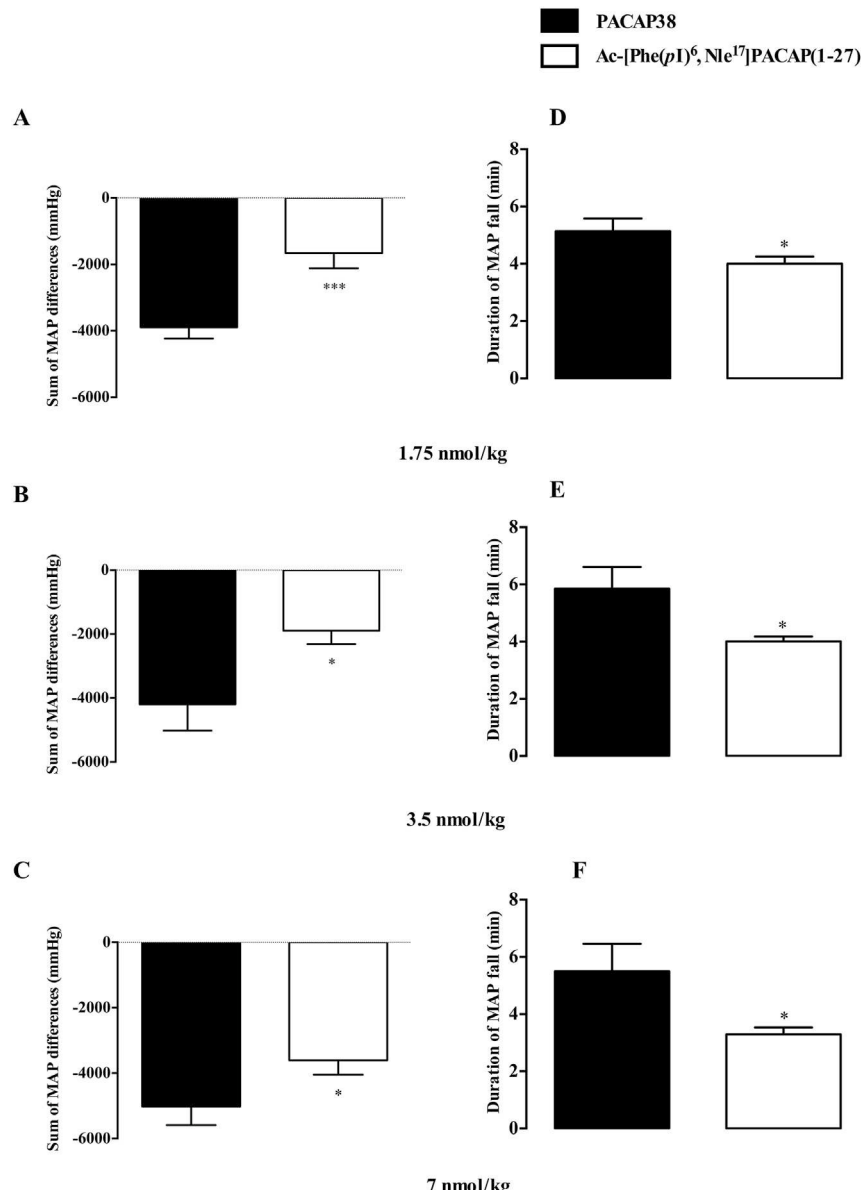


Fig. 6. Effect of PACAP38 and Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) on mean arterial pressure following intravenous administrations of doses of peptides corresponding to 0.5× (1.75 nmol/kg), 1× (3.5 nmol/kg) and 2× (7.0 nmol/kg) that used for the *in vivo* neuroprotection evaluation (3.5 nmol/kg). For panels A, B and C, the y axis corresponds to the summation of MAP differences with basal value over time (in mmHg), measured after the injection up to a stabilized state. For panels D, E and F, the y axis corresponds to time spans (in min) required for a return to a steady blood pressure. Data were analyzed using an unpaired Student's t test. **P* < 0.05 and ****P* < 0.001 are statistically significant compared to PACAP38-treated mice.

MPTP treatment also induces neuroinflammation, a phenomenon that exacerbates neuronal death in neurodegenerative processes. Indeed, it has been reported that MPTP injections generate activation of microglia and upregulation of proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6 (Delgado and Ganea, 2003; Lofrumento et al., 2014). Furthermore, in a PD animal model, it has been shown that VIP exerts a neuroprotective effect by blocking inflammation (Delgado and Ganea, 2003), and this anti-inflammatory activity is also observed with PACAP. Thereupon, the present study revealed that PACAP38 and Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) abolished the induction of the inflammatory markers TNF- α and IL-6 mRNA expression induced by MPTP treatment, as well as the stimulation of the pro-apoptotic caspase 3 mRNA expression. The significant decrease of TNF- α mRNA by either peptide is important to point out because this pro-inflammatory

cytokine is mainly responsible for promoting and maintaining chronic neuroinflammation in PD (Barcia et al., 2005). Thus, modulation of TNF- α should be an essential characteristic of an efficient drug designed to treat PD. Altogether, the results indicate that like PACAP38, Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) possesses *in vitro* and *in vivo* neuroprotective effects linked to a decrease of neuronal apoptosis and a reduction of inflammation. However, besides its neuroprotective effects, it has also been reported that PACAP, through VPAC2 receptor activation, can generate adverse effects such as hypotension, water retention, and tachycardia (Deguil et al., 2010; Farnham et al., 2011; Inglott et al., 2012; Mirfendereski et al., 1997; Tsutsumi et al., 2002; Warren et al., 1992). Also, it has been shown that a VPAC2 agonist exerts deleterious effects in a stroke model (Darsalia et al., 2013). Those observations are particularly important in the view of neurodegenerative disease treatments

because patients with PD present an imbalance of heart autonomic regulation along with orthostatic hypotension (Sanchez-Ferro et al., 2013). Consequently, a PACAP-derived drug useful to treat neurodegenerative diseases must exhibit a potent neuronal anti-apoptotic activity and reduced peripheral effects, especially on the cardiovascular system. The study showed in an *in vivo* model that Ac-[Phe(*pl*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1–27), in spite of its higher metabolic stability, produced lower effects than PACAP38 on MAP, when given intravenously at doses shown to protect efficiently dopaminergic neurons. Furthermore, no tachycardia was observed when compared to control. This result suggests that the relatively low affinity of Ac-[Phe(*pl*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1–27) towards the VPAC receptors is responsible for this behavior. Moreover, the reduced affinity towards all PACAP receptors might decrease the peripheral capture after *iv* injection, thereby favoring brain targeting. Also, the increased stability of Ac-[Phe(*pl*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1–27) extends its biological activity and might contribute to maintain cAMP levels in a range suitable to achieve neuroprotection.

Overall, this study demonstrated the effectiveness of Ac-[Phe(*pl*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1–27) in *in vitro* and *in vivo* PD models as a neuron anti-apoptotic and anti-inflammatory peptide with reduced cardiovascular side effects, as compared to the native peptide hormone. Moreover, the *in vivo* efficiency of the analog against neuronal MPTP toxicity suggested that it crosses the BBB, probably through the non-saturable process associated to PACAP27. No curative treatments against PD have emerged so far and current therapies mainly focus on controlling symptoms. A molecule able to stop the processes giving rise to persistent dopaminergic neuron death would be an ideal asset and therefore it would be very useful to potentially alleviate the PD symptoms. From the results presented in this paper, a PACAP-based therapy could offer such an alternative and Ac-[Phe(*pl*)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1–27) represents a very promising template for the development of selective and effective drug molecules that protect neurons and slow down cell loss.

Q3 Conflict of interest

No conflict of interest is reported.

Uncited reference

Q7 Farnham et al., 2012.

Acknowledgments

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research – FRN102734 (A.F.) and the Interreg PeReNE project (D.V.). D.V. and H.V. are affiliated professors at the Institut National de la Recherche Scientifique – Institut Armand-Frappier. A.F. and D.V. co-supervise A.L. within a France – Quebec thesis co-supervision agreement. We thank Seyma Bahdoudi and Jean-Luc Do Rego for their assistance and fruitful discussion.

References

- Athauda, D., Foltynie, T., 2015. The ongoing pursuit of neuroprotective therapies in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 25–40.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., Komaki, G., Arimura, A., 1993. Passage of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-1–27 and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-1–38 across the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267, 690–696.
- Barcia, C., de Pablos, V., Bautista-Hernandez, V., Sanchez-Bahillo, A., Bernal, I., Fernandez-Villalba, E., Martin, J., Banon, R., Fernandez-Barreiro, A., Herrero, M.T., 2005. Increased plasma levels of TNF- α but not of IL1- β in MPTP-treated monkeys one year after the MPTP administration. *Park. Relat. Disord.* 11, 435–439.
- Blesa, J., Przedborski, S., 2014. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front. Neuroanat.* 8 (155), 1–12.

- Bourgault, S., Vaudry, D., Botia, B., Couvineau, A., Laburthe, M., Vaudry, H., Fournier, A., 2008a. Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides* 29, 919–932.
- Bourgault, S., Vaudry, D., Dejda, A., Doan, N.D., Vaudry, H., Fournier, A., 2009a. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: focus on structure-activity relationships of a neuroprotective Peptide. *Curr. Med. Chem.* 16, 4462–4480.
- Bourgault, S., Vaudry, D., Guilhaudis, L., Raouf, E., Couvineau, A., Laburthe, M., Segalas-Milazzo, I., Vaudry, H., Fournier, A., 2008b. Biological and structural analysis of truncated analogs of PACAP27. *J. Mol. Neurosci.* MN 36, 260–269.
- Bourgault, S., Vaudry, D., Segalas-Milazzo, I., Guilhaudis, L., Couvineau, A., Laburthe, M., Vaudry, H., Fournier, A., 2009b. Molecular and conformational determinants of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) for activation of the PAC1 receptor. *J. Med. Chem.* 52, 3308–3316.
- Bove, J., Martinez-Vicente, M., Dehay, B., Perier, C., Recasens, A., Bombrun, A., Antonsson, B., Vila, M., 2014. BAX channel activity mediates lysosomal disruption linked to Parkinson disease. *Autophagy* 10, 889–900.
- Brown, D., Tamas, A., Reglodi, D., Tizabi, Y., 2013. PACAP protects against salsolinol-induced toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells: implication for Parkinson's disease. *J. Mol. Neurosci.* 50, 600–607.
- Brown, D., Tamas, A., Reglodi, D., Tizabi, Y., 2014. PACAP protects against inflammatory-mediated toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells: implication for Parkinson's disease. *Neurotox. Res.* 260, 230–239.
- Chan-Palay, V., 1991. Alterations in the locus coeruleus in dementias of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.* 88, 625–630.
- Darsalia, V., Mansouri, S., Wolbert, P., Barde, S., Sjöholm, A., Patrone, C., 2013. The specific VPAC2 agonist Bay 55-9837 increases neuronal damage and hemorrhagic transformation after stroke in type 2 diabetic rats. *Neuropeptides* 47, 133–137.
- Deguil, J., Chavant, F., Lafay-Chebassier, C., Perault-Pochat, M.C., Fauconneau, B., Pain, S., 2010. Neuroprotective effect of PACAP on translational control alteration and cognitive decline in MPTP parkinsonian mice. *Neurotox. Res.* 17, 142–155.
- Deguil, J., Jailloux, D., Page, G., Fauconneau, B., Houeto, J.L., Philippe, M., Muller, J.M., Pain, S., 2007. Neuroprotective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in MPP+ induced alteration of translational control in Neuro-2a neuroblastoma cells. *J. Neurosci.* Res. 85, 2017–2025.
- Delgado, M., Ganea, D., 2003. Neuroprotective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) in a mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. *FASEB J. : Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17, 944–946.
- Delgado, M., Jonakait, G.M., Ganea, D., 2002. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit chemokine production in activated microglia. *Glia* 39, 148–161.
- Doan, N.D., Bourgault, S., Dejda, A., Letourneau, M., Dethoux, M., Vaudry, D., Vaudry, H., Chatenet, D., Fournier, A., 2011. Design and *in vitro* characterization of PAC1/VPAC1-selective agonists with potent neuroprotective effects. *Biochem. Pharmacol.* 81, 552–561.
- Emerit, J., Edeas, M., Bricaire, F., 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed. Pharmacother.* 58, 39–46.
- Farnham, M.M., Ingloft, M.A., Pilowsky, P.M., 2011. Intrathecal PACAP-38 causes increases in sympathetic nerve activity and heart rate but not blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H214–H222.
- Farnham, M.M.J., Lung, M.S.Y., Tallapragada, V.J., Pilowsky, P.M., 2012. PACAP causes PAC1/VPAC2 receptor mediated hypertension and sympathoexcitation in normal and hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 303, H910–H917.
- Friedlander, R.M., 2003. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N. Engl. J. Med.* 348, 1365–1375.
- Gourlet, P., Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M.C., Rathe, J., De Neef, P., Robberecht, P., 1995. Fragments of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide discriminate between type I and II recombinant receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 287, 7–11.
- Ingloft, M.A., Lerner, E.A., Pilowsky, P.M., Farnham, M.M., 2012. Activation of PAC(1) and VPAC receptor subtypes elicits differential physiological responses from sympathetic preganglionic neurons in the anaesthetized rat. *Br. J. Pharmacol.* 167, 1089–1098.
- Kellogg Jr., D.L., Zhao, J.L., Wu, Y., Johnson, J.M., 2012. Nitric oxide and receptors for VIP and PACAP in cutaneous active vasodilation during heat stress in humans. *J. Appl. Physiol.* 1985 (113), 1512–1518.
- Langston, J.W., Langston, E.B., Irwin, I., 1984. MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates—clinical and experimental aspects. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 100, 49–54.
- Lazarovici, P., Cohen, G., Arien-Zakay, H., Chen, J., Zhang, C., Chopp, M., Jiang, H., 2012. Multimodal neuroprotection induced by PACAP38 in oxygen-glucose deprivation and middle cerebral artery occlusion stroke models. *J. Mol. Neurosci.* MN 48, 526–540.
- Lee, E.H., Seo, R., 2014. Neuroprotective roles of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in neurodegenerative diseases. *Biochem. Mol. Biol. Rep.* 47, 369–375.
- Lofrumento, D.D., Nicolardi, G., Cianciulli, A., De Nuccio, F., La Pesa, V., Carofiglio, V., Dragone, T., Calvello, R., Panaro, M.A., 2014. Neuroprotective effects of resveratrol in an MPTP mouse model of Parkinson's-like disease: possible role of SOCS-1 in reducing pro-inflammatory responses. *Innate Immun.* 20, 249–260.
- Lutz, E.M., Ronaldson, E., Shaw, P., Johnson, M.S., Holland, P.J., Mitchell, R., 2006. Characterization of novel splice variants of the PAC1 receptor in human

- neuroblastoma cells: consequences for signaling by VIP and PACAP. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 193–209.
- Martins Lopes, F., Schröder, R., Conte da Frota, M.L., Zanotto-Filho, A., Müller, C.B., Pires, A.S., Meurer, R.T., Delevati Colpo, G., Pens Gelain, D., Kapczinski, F., Fonseca Moreira, J.C., da Cruz Fernandes, M., Klamt, F., 2010. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an *in vitro* model for Parkinson disease studies. *Brain Res.* 1337, 85–94.
- Mirfendereski, S., Tobin, G., Hakanson, R., Ekstrom, J., 1997. Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in salivary glands of the rat: origin, and secretory and vascular effects. *Acta Physiol. Scand.* 160, 15–22.
- Nishimoto, M., Furuta, A., Aoki, S., Kudo, Y., Miyakawa, H., Wada, K., 2007. PACAP/PAC1 autocrine system promotes proliferation and astrogenesis in neural progenitor cells. *Glia* 55, 317–327.
- Nonaka, N., Shioda, S., Banks, W.A., 2005. Effect of lipopolysaccharide on the transport of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide across the blood-brain barrier. *Exp. Neurol.* 191, 137–144.
- Pisanu, A., Lecca, D., Mulas, G., Wardas, J., Simbula, G., Spiga, S., Carta, A.R., 2014. Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR-gamma agonist neuroprotective treatment in the MPTP mouse model of progressive Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 71, 280–291.
- Presgraves, S.P., Ahmed, T., Borwege, S., Joyce, J.N., 2004. Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotox. Res.* 5, 579–598.
- Ramos-Alvarez, I., Mantey, S.A., Nakamura, T., Nuche-Berenguer, B., Moreno, P., Moody, T.W., Maderdrut, J.L., Coy, D.H., Jensen, R.T., 2015. A structure-function study of PACAP using conformationally restricted analogs: identification of PAC1 receptor-selective PACAP agonists. *Peptides* 66, 26–42.
- Rat, D., Schmitt, U., Tippmann, F., Dewachter, I., Theunis, C., Wiczczak, E., Postina, R., van Leuven, F., Fahrenholz, F., Kojro, E., 2011. Neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) slows down Alzheimer's disease-like pathology in amyloid precursor protein-transgenic mice. *FASEB J.: Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 25, 3208–3218.
- Ravni, A., Bourgault, S., Lebon, A., Chan, P., Galas, L., Fournier, A., Vaudry, H., Gonzalez, B., Eiden, L.E., Vaudry, D., 2006. The neurotrophic effects of PACAP in PC12 cells: control by multiple transduction pathways. *J. Neurochem.* 98, 321–329.
- Reglodi, D., Fabian, Z., Tamas, A., Lubics, A., Szeberenyi, J., Alexy, T., Toth, K., Marton, Z., Borsiczky, B., Roth, E., Szalontay, L., Lengvari, I., 2004a. Effects of PACAP on *in vitro* and *in vivo* neuronal cell death, platelet aggregation, and production of reactive oxygen radicals. *Regul. Pept.* 123, 51–59.
- Reglodi, D., Kiss, P., Lubics, A., Tamas, A., 2011. Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases *in vitro* and *in vivo*. *Curr. Pharm. Des.* 17, 962–972.
- Reglodi, D., Lubics, A., Tamas, A., Szalontay, L., Lengvari, I., 2004b. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects dopaminergic neurons and improves behavioral deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* 151, 303–312.
- Robberecht, P., Gourlet, P., De Neef, P., Woussen-Colle, M.C., Vandermeers-Piret, M.C., Vandermeers, A., Christophe, J., 1992. Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylate-cyclase-activating-peptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. Discovery of PACAP(6–38) as a potent antagonist. *Eur. J. Biochem./FEBS* 207, 239–246.
- Sanchez-Ferro, A., Benito-Leon, J., Gomez-Esteban, J.C., 2013. The management of orthostatic hypotension in Parkinson's disease. *Front. Neurol.* 4, 64.
- Seaborn, T., Masmoudi-Kouli, O., Fournier, A., Vaudry, H., Vaudry, D., 2011. Protective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) against apoptosis. *Curr. Pharm. Des.* 17, 204–214.
- Shioda, S., Ohtaki, H., Nakamachi, T., Dohi, K., Watanabe, J., Nakajo, S., Arata, S., Kitamura, S., Okuda, H., Takenoya, F., Kitamura, Y., 2006. Pleiotropic functions of PACAP in the CNS: neuroprotection and neurodevelopment. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1070, 550–560.
- Shivers, K.Y., Nikolopoulou, A., Machlovi, S.I., Vallabhajosula, S., Figueiredo-Pereira, M.E., 2014. PACAP27 prevents Parkinson-like neuronal loss and motor deficits but not microglia activation induced by prostaglandin J2. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 1707–1719.
- Tamas, A., Reglodi, D., Farkas, O., Kovessi, E., Pal, J., Povlishock, J.T., Schwarcz, A., Czeiter, E., Szanto, Z., Doczi, T., Buki, A., Bukovics, P., 2012. Effect of PACAP in Central and peripheral nerve injuries. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 8430–8448.
- Tsutsumi, M., Claus, T.H., Liang, Y., Li, Y., Yang, L., Zhu, J., Dela Cruz, F., Peng, X., Chen, H., Yung, S.L., Hamren, S., Livingston, J.N., Pan, C.Q., 2002. A potent and highly selective VPAC2 agonist enhances glucose-induced insulin release and glucose disposal: a potential therapy for type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 1453–1460.
- Valadas, J.S., Vos, M., Verstreken, P., 2014. Therapeutic strategies in Parkinson's disease: what we have learned from animal models. *Ann. N.Y. Acad. Sci. Epub* 1–22. <http://dx.doi.org/10.1111/nyas.12577>.
- Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., Basille, M., Burel, D., Wurtz, O., Fournier, A., Chow, B.K., Hashimoto, H., Galas, L., Vaudry, H., 2009. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol. Rev.* 61, 283–357.
- Vaudry, D., Gonzalez, B.J., Basille, M., Yon, L., Fournier, A., Vaudry, H., 2000. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* 52, 269–324.
- Vaudry, D., Pamantung, T.F., Basille, M., Rousselle, C., Fournier, A., Vaudry, H., Beauvillain, J.C., Gonzalez, B.J., 2002. PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1451–1460.
- Wang, G., Pan, J., Tan, Y.Y., Sun, X.K., Zhang, Y.F., Zhou, H.Y., Ren, R.J., Wang, X.J., Chen, S.D., 2008. Neuroprotective effects of PACAP27 in mice model of Parkinson's disease involved in the modulation of K(ATP) subunits and D2 receptors in the striatum. *Neuropeptides* 42, 267–276.
- Warren, J.B., Cockcroft, J.R., Larkin, S.W., Kajekar, R., Macrae, A., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 1992. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is a potent vasodilator in humans. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20, 83–87.
- Waschek, J.A., 2013. VIP and PACAP: neuropeptide modulators of CNS inflammation, injury, and repair. *Br. J. Pharmacol.* 169, 512–523.
- Wilms, H., Zecca, L., Rosenstiel, P., Sievers, J., Deuschl, G., Lucius, R., 2007. Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications. *Curr. Pharm. Des.* 13, 1925–1928.
- Xie, H.R., Hu, L.S., Li, G.Y., 2010. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin. Med. J.* 123, 1086–1092.

Article 2

*'' Tout grand progrès scientifique est né d'une nouvelle audace de
l'imagination''
John Dewey*

Chapitre 3 : Article 2

Effect of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on the autophagic activation observed in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease

Effet du pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide sur le processus autophagique observé dans des modèles in vitro et in vivo de la maladie de Parkinson

Asma Lamine-Ajili ^{a, b, c, d}, Ahmed Fahmi ^{a, d}, Myriam Létourneau ^{a, c}, David Chatenet ^{a, e}, Patrick Labonté ^{a, e}, David Vaudry ^{b, c, e}, Alain Fournier ^{a, c, e*}

^a INRS – Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada

^b INSERM-U982, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, IRIB, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

^c Laboratoire International Associé Samuel de Champlain, France/Canada

^d Equal contribution

^e Co-senior authors

* Auteur de correspondance :

Pr Alain Fournier

Institut national de la recherche scientifique

INRS – IAF, 531 boul. des Prairies, Laval, QC, Canada H7V 1B7

Téléphone : 1-450-687-5010 ext. 8816

Courriel : alain.fournier@iaf.inrs.ca

Cet article est publié dans **BBA - Molecular Basis of Disease**, vol. 1862, p. 688-695, 2016

DOI: [10.1016/j.bbadis.2016.01.005](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.01.005)

Résumé de l'article en français

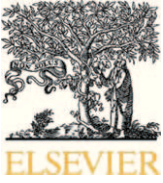
La maladie de Parkinson (MP) est une pathologie neurodégénérative caractérisée par la destruction des neurones dopaminergiques du mésencéphale. Ce processus délétère est induit par un mécanisme de mort cellulaire programmée qui peut être bloqué par le pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). Diverses preuves scientifiques indiquent que l'autophagie, un processus d'épuration de la cellule, est activée au cours de cette pathologie. Néanmoins, le rôle qu'elle occupe dans le développement des maladies neurodégénératives est encore obscur. De plus, le potentiel du PACAP à moduler l'activation du processus autophagique associé à ces troubles n'a jamais été abordé. De ce fait, nous avons exploré la capacité du PACAP à moduler l'autophagie induite par le 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP⁺) ou son précurseur le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP), deux agents neurotoxiques reproduisant respectivement *in vitro* et *in vivo* des caractéristiques de la MP en provoquant spécifiquement la destruction des neurones dopaminergiques. Suite à l'exposition des cellules et des animaux aux agents neurotoxiques, le PACAP a réduit l'activité autophagique, comme évaluée par la production à la baisse de la forme LC3-II, a rétabli les niveaux protéiques de p62, et a diminué la formation des vacuoles autophagiques. La capacité du PACAP à inhiber l'autophagie a également été observée *in vitro*, et ce, en inhibant l'activité de p62 induite par la rapamycine, une molécule identifiée comme un inducteur puissant de l'autophagie. Ainsi, les résultats obtenus au cours de cette étude ont démontré que l'autophagie est effectivement induite dans des modèles expérimentaux de la MP et que le PACAP montre non seulement une diminution de l'expression de la caspase-3, enzyme clé de l'apoptose mais aussi des propriétés antiautophagiques.

Contribution de l'étudiant

Mon collègue Ahmed Fahmy, étudiant gradué sous la supervision du Pr Patrick Labonté, et moi-même sommes copremiers auteurs de ce travail. Ensemble, nous avons réalisé la majorité des expériences sauf celles portant sur la viabilité neuronale in vitro et in vivo qui ont été réalisées par moi seule. La version initiale du manuscrit a été rédigée par moi-même. Myriam Létourneau, Ahmed Fahmy et David Chatenet ont apporté de précieux conseils et ont révisé le manuscrit. Patrick Labonté a participé à l'étude en apportant son expertise reliée à l'autophagie. Il a aussi révisé le manuscrit. Mes codirecteurs de thèse, David Vaudry et Alain Fournier, en association avec David Chatenet, Myriam Létourneau et Patrick Labonté, ont conçu le projet, émis les hypothèses, supervisé mon travail et révisé le manuscrit de manière à produire la version finale.

Au cours de cette étude notre travail a consisté à :

- Explorer l'effet du PACAP sur le processus autophagique activé in vitro dans un modèle de la MP.
- Déterminer en partie si la modulation du flux autophagique par le peptide est directe ou indirecte.
- Explorer l'effet antiautophagique du PACAP dans un modèle murin de la MP.



Effect of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on the autophagic activation observed in *in vitro* and *in vivo* models of Parkinson's disease



Asma Lamine-Ajili^{a,b,c,1}, Ahmed M. Fahmy^{a,1}, Myriam Létourneau^{a,c}, David Chatenet^{a,2}, Patrick Labonté^{a,2}, David Vaudry^{b,c,2}, Alain Fournier^{a,c,*}

^a INRS, Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, QC, Canada H7V 1B7

^b INSERM-U982, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, IIRB, Université de Rouen, 76821, Mont-Saint-Aignan, France

^c Laboratoire Samuel-de-Champlain, Université de Rouen, France/INRS, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 September 2015

Received in revised form 10 December 2015

Accepted 4 January 2016

Available online 6 January 2016

Keywords:

Autophagy

PACAP

Neurodegeneration

Dopaminergic neuron survival

Mitochondrial functions

SH-SY5Y neuroblastoma cell survival

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder that leads to destruction of the midbrain dopaminergic (DA) neurons. This phenomenon is related to apoptosis and its activation can be blocked by the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). Growing evidence indicates that autophagy, a self-degradation activity that cleans up the cell, is induced during the course of neurodegenerative diseases. However, the role of autophagy in the pathogenesis of neuronal disorders is yet poorly understood and the potential ability of PACAP to modulate the related autophagic activation has never been significantly investigated. Hence, we explored the putative autophagy-modulating properties of PACAP in *in vitro* and *in vivo* models of PD, using the neurotoxic agents 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), respectively, to trigger alterations of DA neurons. In both models, following the toxin exposure, PACAP reduced the autophagic activity as evaluated by the production of LC3 II, the modulation of the p62 protein levels, and the formation of autophagic vacuoles. The ability of PACAP to inhibit autophagy was also observed in an *in vitro* cell assay by the blocking of the p62-sequestration activity produced with the autophagy inducer rapamycin. Thus, the results demonstrated that autophagy is induced in PD experimental models and that PACAP exhibits not only anti-apoptotic but also anti-autophagic properties.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder with a significant prevalence in elderly people. It evolves slowly and is distinguished by the appearance of movement disorders characterized by

Abbreviations: Akt, protein kinase B; Bcl-2, B-cell lymphoma 2 anti-apoptotic protein; DA, dopaminergic; DAPI, 2-(4-amidinophenyl)-1 H-indole-6-carboxamide hydrochloride; FBS, fetal bovine serum; GFP, green fluorescent protein; JNK, c-Jun. N-terminal kinase; LC3 I and II, microtubule-associated protein light chain 3 I and II; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MPP⁺, 1-methyl-4-phenylpyridinium; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; MTP, mitochondrial transmembrane potential; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2 H-tetrazolium; PAC1, PACAP receptor; PACAP, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; PACAP38 or P38, 38-amino acid isoform of PACAP; PBS, phosphate buffer saline; PD, Parkinson's disease; PFA, paraformaldehyde; ROS, reactive oxygen species; SN, *substantia nigra*; SNpc, *substantia nigra pars compacta*; TBST, Tris-buffered saline with Tween 20; TH, tyrosine hydroxylase; VIP, vasoactive intestinal peptide; VPAC1, VIP/PACAP type 1 receptor; VPAC2, VIP/PACAP type 2 receptor.

* Corresponding author at: Institut National de la Recherche Scientifique, INRS-IAF, 531 boul. des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7.

E-mail address: alain.fournier@iaf.inrs.ca (A. Fournier).

¹ Equal contribution.

² Co-senior authors.

instability, postural rigidity, tremor at rest, and bradykinesia/akinesia [1,2]. It is associated with a massive destruction of neurons in the brainstem, particularly the dopaminergic (DA) neurons of the *substantia nigra* (SN) [3]. Although neuronal death mechanisms remain poorly understood, several studies showed that loss of DA neurons is particularly caused by alteration of mitochondrial functions [4–6]. In fact, during the neurodegenerative course, reactive oxygen species (ROS) are generated and they subsequently alter cell components, thereby inducing cellular stress and giving rise to processes such as apoptosis and autophagy [7–9]. While apoptosis is a programmed cell death mechanism, autophagy is considered as a self-degradation action that occurs in normal physiological conditions to clean up the cell from defective intracellular components. Indeed, altered cytoplasmic organelles are processed by lysosomes to purify the cell through the autophagic process [10]. Hence, conditions associated with an increase in cellular stress promote changes in cellular organelles and might induce autophagy. Moreover, in more acute conditions of organelle alterations, autophagy might become deleterious to cell survival. Autophagy was shown to be involved in a variety of pathologies including cancer, infection and inflammation [11]. Furthermore, some studies showed that autophagy is observed during the development of neurodegenerative

illnesses such as the Alzheimer's and Parkinson's diseases [12–14]. Nevertheless, the precise role of autophagy in the pathogenesis of neuronal disorders is yet inadequately understood. Indeed, in ischemia and brain injuries, as well as in neurodegenerative diseases, some reports suggested that activation of autophagy might be beneficial while others revealed that it would be harmful for the cell [15–18]. Similarly, other studies demonstrated that inhibition or activation of autophagy produced protective effects depending on the stress conditions [19–22].

The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a neuropeptide that exerts a large array of actions *via* the activation of three different G protein-coupled receptors, *i.e.* PAC1, VPAC1 and VPAC2 [23]. This molecule is a potent anti-apoptotic, anti-inflammatory and vasodilating substance [24–27], and these biological activities are essentially mediated through PAC1, VPAC1 and VPAC2, respectively [28–30]. In particular, by reducing apoptosis, PACAP exhibits potent neuroprotective effects in experimental cellular and animal models of pathologies and neuronal damages, including cerebral ischemia and brain injuries, as well as Alzheimer's and Parkinson's diseases [31–34]. Hence, PACAP is able to protect against neurotoxic agents several cell types such as PC12 cells, GIRK2-positive and GIRK2-negative dopamine neurons of primary ventral midbrain cultures, as well as Neuro-2a neuroblastoma cells [35,31]. It has been clearly established that PACAP modulates several pathways involved in apoptosis to promote neuroprotective effects. Indeed, in many *in vitro* studies of neuronal injuries, PACAP induced Bcl-2 expression, stimulated the Akt/MAPK cascade, inhibited the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway, and blocked caspase activation [36–40]. Moreover, as demonstrated by our previous work, selective PAC1/VPAC1 analogs exert anti-apoptotic effects against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)- and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced neurotoxicities [41,42]. The compound MPP⁺ is a neurotoxic agent used to mimic *in vitro* features of Parkinson's disease, whereas its reduced form, MPTP, is utilized to reproduce *in vivo* Parkinsonian symptoms. Studies have demonstrated that MPP⁺ inhibits the mitochondrial complex I, thus causing neuronal death [43,44]. Interestingly, it has also been reported that MPP⁺ is able to modulate autophagy in different manners, according to the conditions of stress (*e.g.* hypoxia, serum depletion) and its duration [19,45,46]. Therefore, MPTP and MPP⁺ cause not only neuronal death through apoptosis but also modulate autophagy [47]. Furthermore, it was shown that cyclic adenosine monophosphate (cAMP), a second messenger produced following the activation of adenylyl cyclase by PACAP, and protein kinase A (PKA), an enzyme with an activity dependent on the cellular level of cAMP, regulate MPP⁺-induced autophagy [48]. Henceforth, in the present investigation, we assessed the activation of the autophagic response induced by MPP⁺ and MPTP in *in vitro* and *in vivo* models that reproduce characteristics of PD and we evaluated the effect of exogenous PACAP on MPP⁺- and MPTP-induced autophagy.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Otherwise stated, chemicals and cell culture media were purchased from Sigma-Aldrich (Mississauga, ON, CAN) and Fisher Scientific (Nepean, ON, CAN). JC-1 was acquired from Life Technologies (Burlington, ON, CAN), and the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2 H-tetrazolium (MTS) assay kit was obtained from Promega (Madison, WI, USA). PACAP was synthesized in our laboratory using a Rink-amide-AM resin as the solid support, and a standard Fmoc-based chemistry [49]. After acidic cleavage and purification, PACAP was characterized by MALDI-TOF mass spectrometry and analytical RP-HPLC (purity >95%). A LC3-green fluorescent protein expression vector construct (peGFP-LC3) was kindly provided by Dr. Tamotsu Yoshimori (Osaka University, JPN). Mouse monoclonal anti-p62 antibody was bought from Abnova

(Walnut, CA, USA) while rabbit anti-tyrosine hydroxylase (TH), mouse monoclonal anti- β -tubulin as well as goat anti-mouse HRP-conjugated antibodies were from Millipore (Morsheim, FRA or Etobicoke, ON, CAN). Mouse monoclonal anti-actin and rabbit anti-LC3 antibodies were purchased from Sigma-Aldrich (Mississauga, ON, CAN). Mouse monoclonal anti-GAPDH antibody and goat anti-rabbit HRP-conjugated antibody were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Finally, AlexaFluor488-conjugated secondary antibody was from Life Technologies (Longjumeau, FRA or Burlington, ON, CAN).

2.2. Cell culture

The SH-SY5Y cells, which are human neuroblastoma cells naturally expressing PAC1 and VPAC2 receptors but not VPAC1 [50], were cultured in a 1:1 mixture of Ham's F12 Nutrient and MEM media supplemented with 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 UI/mL each of penicillin and streptomycin, and 15% FBS. The cell line was maintained as a monolayer at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and cell passages were performed by trypsinization when cells were at 80% confluence.

2.3. Cell survival

Assessment of SH-SY5Y cell survival upon MPP⁺ treatment, in the presence or not of PACAP, was carried out as previously published [42]. Briefly, cells were seeded in 96-well plates and incubated 48 h prior to the test. A concentration of 100 nM of PACAP38 was applied to the cells 4 h before a MPP⁺ treatment (1.5 mM) of 24 h. Cell survival was evaluated with a MTS assay kit following the manufacturer's recommendations.

2.4. Mitochondrial transmembrane potential (MTP) assay

Change of MTP was measured using the fluorescent probe JC-1 following a procedure described in a previous publication [42]. Briefly, SH-SY5Y cells were treated as described above for the survival assay and then, incubated for 15 min, at 37 °C, with the JC-1 probe (10 μ g/mL). JC-1 fluorescence was measured with a SpectraMax M Series multi-mode microplate reader using the SoftMax Pro Software (Molecular Devices, CA, USA).

2.5. Animals

Ten-week-old male C57Bl/6 mice were obtained from Charles Rivers Laboratories (L'Arbresle, FRA) and acclimatized for 1 week in the animal facility, in controlled temperature and lighting conditions (23 \pm 1 °C, light on from 8 a.m. to 8 p.m.) with free access to food and water. Experiments were performed under the supervision of an authorized investigator (D.V.) in accordance with the French Ministry of Agriculture and the European communities' council directive 2010/63/UE of September 22, 2010 (approval number N/01-12-11/24/12-14).

2.6. *In vivo* neuroprotection assessment

This set of experiments was based on a publication by Deguil et al. [51]. Four groups of 7 animals were formed: Control, MPTP, PACAP, and MPTP + PACAP. From day 1 to day 5, animals received 2 different injections: a 100 μ L intraperitoneal (*i.p.*) injection of MPTP (30 mg/kg/day) and then 1 h later a 100 μ L intravenous (*i.v.*) injection of 3.5 nmol/kg/day of PACAP38, *i.e.* 15.7 μ g/kg/day. Whenever a compound was not given, a saline injection of the same volume was performed. Mice from each group were sacrificed 3 days after the last injection and the brain proteins/tissues were used for Western blot and immunohistochemistry experiments.

2.7. Immunohistochemistry

Three animals from each group described in Section 2.6 were used to perform immunohistochemistry on brain tissue slices. Animals were anesthetized with pentobarbital (40 mg/kg body weight i.p.) and an intracardiac saline perfusion was performed to evacuate blood. A 4% paraformaldehyde (PFA) solution prepared in PBS was then perfused for prefixation of tissues. Animals were decapitated and the brain was removed and incubated overnight at 4 °C in a 4% PFA solution. To prepare tissues for cryopreservation, two consecutive 24 h treatments in 15% and 30% sucrose/PBS solutions, respectively, were performed and finally brains were stored in Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek, Villeneuve d'Ascq, FRA) at –80 °C until use. Tissues were cut with a cryostat (Leica CM3050; Leica Microsystems, Nanterre, FRA), and mounted onto gelatin-coated glass slides. Brain slices were blocked with normal donkey or goat serum for 90 min at room temperature and then incubated overnight at 4 °C with a rabbit anti-LC3 primary antibody (1:200 dilution). This was followed by a second incubation with an AlexaFluor 488®-conjugated donkey anti-rabbit antibody or an AlexaFluor 488®-conjugated goat anti-rabbit antibody, respectively. Images were acquired using a Zeiss LSM 780 laser scanning confocal microscope.

2.8. Autophagic flux monitoring

SH-SY5Y cells were seeded into 6-well plates, at a density of 5×10^5 cells per well and incubated 24 h to ensure cell adhesion. Then, they were transfected with peGFP-LC3, an expression vector for GFP-labeled LC3, using the Trans IT-2020 transfection reagent, as recommended by the supplier (Mirus Bio, Madison, WI, USA). After 24 h, cells were trypsinized and seeded in 24-well plates over coverslips. Cells were then treated with PACAP and/or MPP⁺, as described for the survival assay. Coverslips were finally submitted to an immunofluorescence protocol with appropriate antibodies, as described below.

2.9. Immunofluorescence protocol

SH-SY5Y cells were seeded into 24-well plates containing coverslips, at a density of 75×10^3 cells per well, and incubated 48 h to ensure cell adhesion. After being submitted to the desired cell treatment, the medium was removed and the coverslips with cells were washed twice with PBS before being fixed with 4% PFA in PBS for 10 min. Next, coverslips were incubated in blocking buffer (PBS, 3% bovine serum albumin, 10% FBS, 0.1% Triton X-100) for 30 min at RT. After washing with PBS, the coverslips were incubated for 1 h at RT with a primary antibody diluted in blocking buffer. Coverslips were then washed in PBS and incubated with either Alexa fluor™-(488 or 568) goat anti-mouse IgG or Alexa fluor™-(488 or 568) goat anti-rabbit IgG for 1 h at RT. Thereafter, coverslips were washed twice with PBS and were incubated 5 min with DAPI to stain the nuclei. Finally, coverslips were washed again twice with PBS and were mounted on glass slides with Prolong™ Antifade (Life Technologies, Burlington, ON, CAN) to be examined.

2.10. Western blot analyses

Proteins from SH-SY5Y cells or SN proteins obtained from brains of each animal group were prepared as described previously [42]. Protein samples (20 µg) were subjected to 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto a PVDF membrane (Amersham, Les Ulis, FRA). Blocking was performed in a solution composed of 5% skim milk in 50 mM Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBST), and membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies (1:1000 dilution) against LC3, p62, actin, TH or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 1:4000 dilution) prepared in the same blocking solution. Afterwards, membranes were washed with TBST and then incubated 1 h at RT, in PBS

containing 5% skim milk, with goat-anti-rabbit IgG (1:10⁴ dilution) conjugated to horseradish peroxidase. Protein bands were visualized with either the Super Signal West-Pico or -Femto chemiluminescence substrates (Pierce-ThermoFisher, Nepean, ON, CAN).

2.11. Statistical analysis

All data are from 3 to 4 independent experiments. Prism software (Graphpad Software, CA, USA) was used to analyze data. Data are expressed as mean ± S.E.M. and statistical evaluation of the results was performed by ANOVA followed by a Bonferroni's test. Results were considered significant with $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of PACAP on MPP⁺-induced alterations and death of SH-SY5Y cells

According to a protocol used previously, SH-SY5Y cells were treated with PACAP38 (100 nM) 4 h prior to MPP⁺ exposure (1.5 mM) [42]. In such conditions, MPP⁺, a neurotoxic agent that produces similar cellular

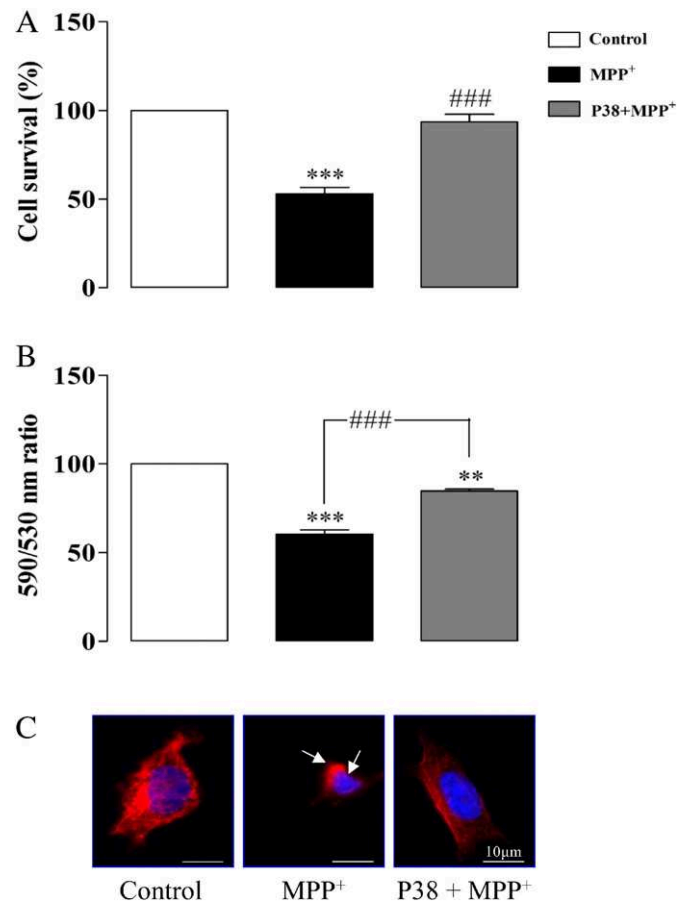


Fig. 1. Neuroprotective effect of PACAP38 (P38) in an *in vitro* model of Parkinson's disease. (A) Effect of MPP⁺ (1.5 mM) with or without a 4 h pre-treatment with PACAP38 (100 nM) on SH-SY5Y cell survival. (B) Effect of PACAP38 on MPP⁺-induced alteration of mitochondrial membrane potential in SH-SY5Y cells in the same conditions as in Fig. 1A. Mitochondrial transmembrane potential was assessed using the JC-1 probe, and the ratio of fluorescence emissions 590/530 nm was measured as an index of proper function. (C) Immunofluorescence images in which microtubules were revealed with an anti-tubulin antibody and nuclei were stained with DAPI. The photographs illustrate the beneficial effect of PACAP on MPP⁺-induced morphological changes of SH-SY5Y cells treated in the same conditions as described in Fig. 1A. Each value represents the mean ± S.E.M. of at least 3 independent assays performed in octuplicate. Statistical analyses were carried out using an ANOVA followed by the Bonferroni's test. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs control. ### $p < 0.001$ vs MPP⁺-treated cells.

features as those observed in PD, caused approximately 50% cell death (Fig. 1A) but this effect was almost fully counteracted with PACAP pre-treatment (Fig. 1A). Considering that MPP⁺ produces permeabilization of the mitochondrial outer membrane, we examined the ability of PACAP to prevent the deleterious effect of MPP⁺ on mitochondrial transmembrane potential (MTP) using the fluorescent ratiometric probe JC-1. Treatment of SH-SY5Y cells with MPP⁺ (1.5 mM) for 24 h induced a significant reduction of the 590/530 nm fluorescence emission ratio, thereby indicating that the mitochondrial integrity was severely altered by the toxic molecule (Fig. 1B). In this assay, PACAP had no effect on the fluorescence emission ratio per se (data not shown), but it decreased the effect of MPP⁺ on MTP when added 4 h prior to the toxin treatment (Fig. 1B). Next, in order to study the effect of PACAP on MPP⁺-induced morphological alterations of SH-SY5Y cells, we evaluated by immunofluorescence their structural changes in the presence of the peptide and/or the neurotoxic agent (Fig. 1C). Treatment with MPP⁺ (1.5 mM) for 24 h induced a marked destabilization of microtubules, which was assessed by immunostaining of β -tubulin III, a member of the tubulin protein family located in the cytoplasm of neurons. This effect was markedly reduced by PACAP (Fig. 1C). As a matter of fact, the results showed that the control neurons exhibited a streaked cytoskeleton around the nucleus and dendritic extensions, whereas MPP⁺-treated cells displayed cytoplasmic shrinkage and absence of dendritic extensions. Nevertheless, PACAP was able to counteract the morphological changes exerted by MPP⁺ and restored the healthy appearance of the cell.

3.2. In vitro effect of PACAP on MPP⁺-induced LC3 II formation and p62/SQSTM1 degradation

As shown in several studies related to neurodegenerative diseases, MPP⁺ induces cell death and autophagy [19,46,52,53]. In order to explore the effect of PACAP on autophagy induced in a PD model, we investigated the mechanism involved in MPP⁺-induced autophagy and studied the action of PACAP on the autophagic flux. Along with the reduction of cell viability induced by 1.5 mM MPP⁺ [42], it was observed that this treatment produced a significant accumulation of microtubule-associated protein light chain 3 II (LC3 II), which is related to autophagy induction (Fig. 2A and B, 3rd column vs control). In parallel, p62/SQSTM1, an adaptor protein involved in the engulfment process of ubiquitinated proteins by phagophore to form autophagosomes, which thereafter fuse with lysosomes to produce the degradation of the ingested material, became much less abundant after MPP⁺ treatment (Fig. 2A and C, 3rd column vs control). PACAP exposure restored the level of LC3 II to basal level (Fig. 2A and B, 4th column vs control), and stopped p62 degradation induced by the MPP⁺ treatment (Fig. 2A and C, 4th column vs control). Interestingly, albeit it was not significant, PACAP itself seemed to slightly increase the LC3 II and p62 levels (Fig. 2A, B and C, 2nd column vs control). These findings strongly suggest that PACAP inhibits MPP⁺-induced autophagy. In order to support these results, SH-SY5Y cells were treated with rapamycin, an inducer of autophagy, in the presence or absence of PACAP. As expected, rapamycin treatment induced p62 protein degradation. However, this effect was

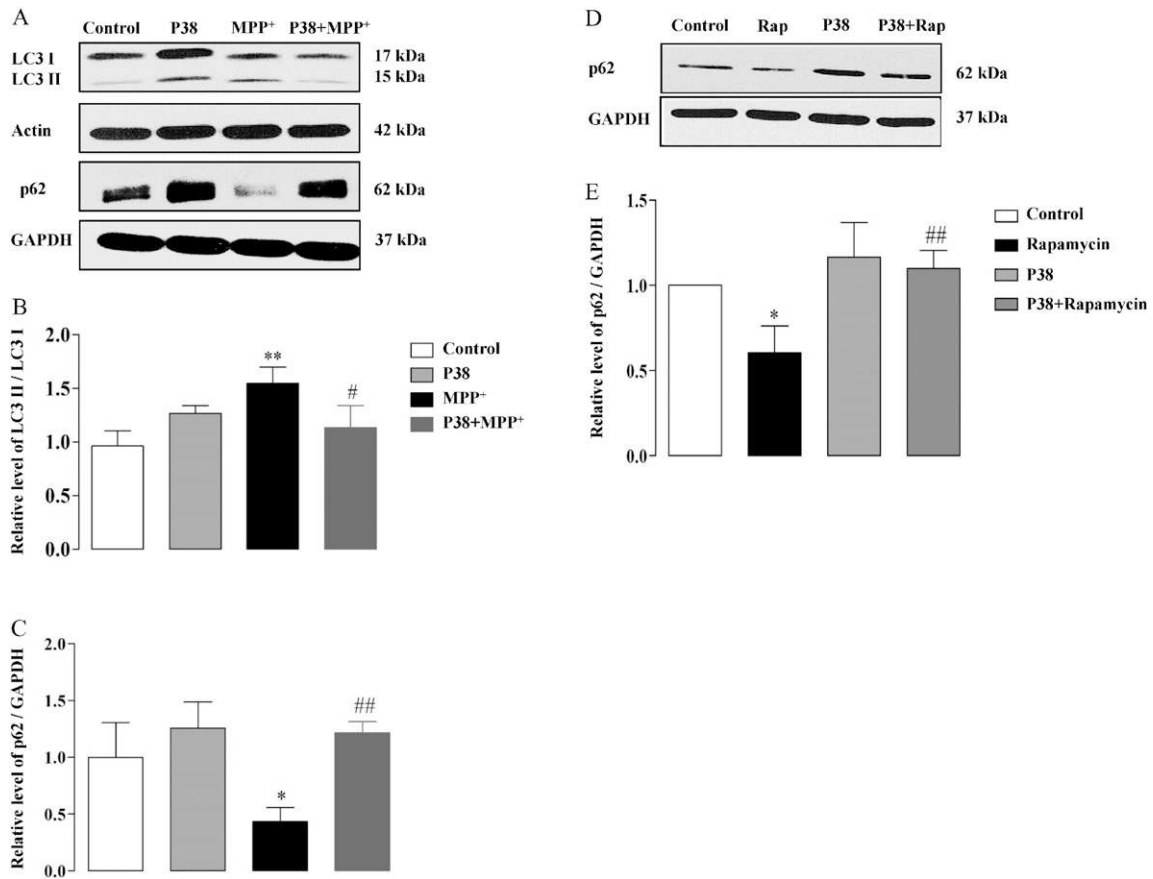


Fig. 2. Effects of PACAP38 (P38), MPP⁺, and P38 + MPP⁺ on the autophagy-related proteins LC3 and p62/SQSTM1 in SH-SY5Y cells. (A) Digital photographs illustrating the expression of LC3 I and II, and p62/SQSTM1 after immunoblotting. (B) Bar graphs displaying the relative abundance of LC3 II vs I measured by densitometry of the bands obtained on immunoblots, and standardized with actin. (C) Bar graphs displaying the relative abundance of p62/SQSTM1 measured by densitometry of the bands obtained in immunoblots. (D) Digital photographs of immunoblots illustrating the expression of p62/SQSTM1 in SH-SY5Y cells in presence of 200 nM rapamycin (Rap), an autophagy inducer, PACAP38 (P38 – 100 nM), or P38 + Rap. (E) Bar graphs displaying the relative abundance of p62/SQSTM1 measured by densitometry of the bands obtained in immunoblots. Each value represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. Statistical analyses were carried out using an ANOVA followed by the Bonferroni's test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; vs control. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ vs MPP⁺ or rapamycin-treated cells.

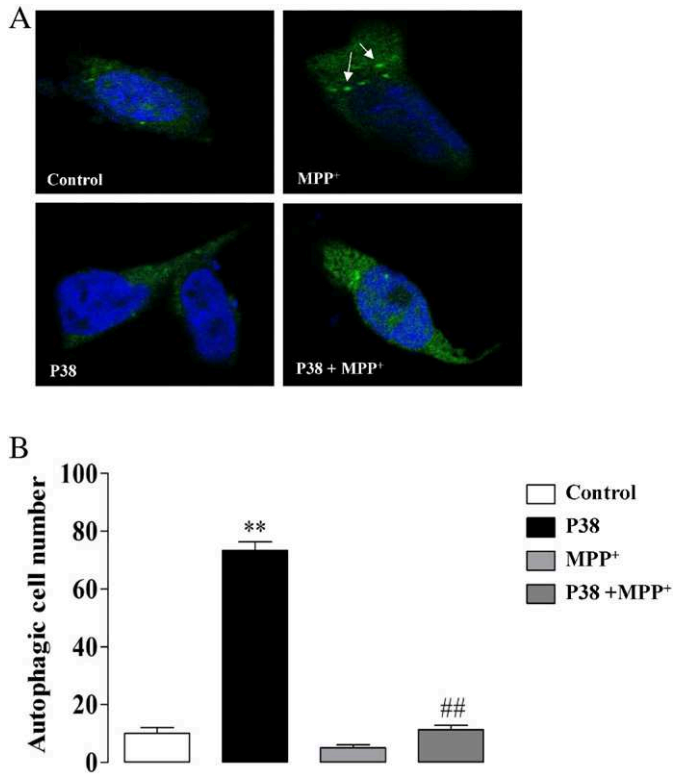


Fig. 3. Effect of PACAP38 against MPP⁺-induced autophagic vacuoles (pointed out with white arrows). (A) Representative images of SH-SY5Y cells transfected with a GFP-LC3-encoding plasmid, cultured in complete medium for 24 h, and pretreated (or not) for 4 h with 100 nM PACAP38 and/or treated with 1.5 mM MPP⁺. (B) Bar graphs displaying the relative abundance of autophagic cells calculated as percentage of total cells (in randomly selected 100 cells). A cell was considered in an autophagic state when it was containing >5 autophagosomes. Each value represents the mean ± S.E.M. of three independent experiments. Statistical analyses were carried out using an ANOVA followed by the Bonferroni's test. ***p* < 0.01 vs control and ##*p* < 0.01 vs MPP⁺-treated cells.

abolished when cells were co-treated with PACAP (Fig. 2D and E). To further document this finding, autophagosome accumulation was assessed upon MPP⁺ treatment. To achieve this, GFP-LC3 was expressed in SH-SY5Y cells before treatment with MPP⁺ and/or PACAP (Fig. 3A and B). In line with our previous results, SH-SY5Y cells treated with MPP⁺ showed a clear accumulation of autophagosomes, as indicated by GFP-LC3 puncta (Fig. 3A). However, treatment with PACAP prior to addition of MPP⁺ diminished autophagosome formation as almost no LC3 puncta remained visible (Fig. 3A and B).

3.3. *In vivo* effect of PACAP on MPTP-induced LC3 II formation and p62/SQSTM1 degradation

A decrease of TH expression in DA neurons within the *substantia nigra* is a hallmark of PD. Accordingly, as described previously [42], TH expression in the SN *pars compacta* (SNpc) dopaminergic neurons was markedly reduced in mice that had received MPTP injection (Fig. 4A). Also, TH immunostaining in MPTP-treated mice that had received an i.v. injection of PACAP went back to normal, confirming the neuroprotective action of the peptide [42]. To investigate the possible involvement of autophagy in those effects, the impact of MPTP and PACAP on *in vivo* regulation of LC3 and p62 was also evaluated. In line with the *in vitro* findings, subchronic injections of MPTP increased LC3 II accumulation (Fig. 4B). However, surprisingly, they did not trigger significant degradation of p62 when compared to sham (Fig. 4B and C). Injections of PACAP had no obvious effects on LC3 II and p62 production (Fig. 4B and C) but this treatment appeared to counteract the effect of MPTP on LC3 II levels (Fig. 4B). To further confirm the inhibitory effect of PACAP on autophagy, brain slices of the SNpc region were immunostained with anti-LC3 II antibody in order to label autophagic vacuoles. After subchronic injections of MPTP, the SNpc revealed several puncta of LC3 indicative of the presence of autophagic vacuoles (Fig. 5). However, such LC3 II-associated puncta were not observed following treatments with PACAP alone or PACAP with MPTP (Fig. 5).

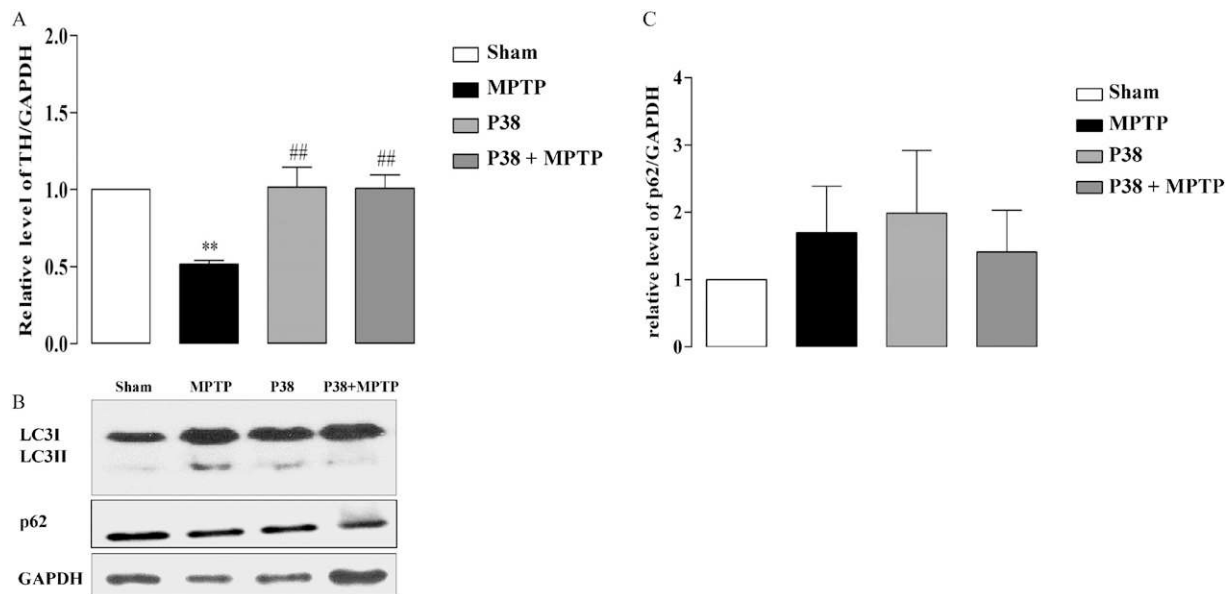


Fig. 4. Neuroprotective effect of PACAP38 on MPTP-induced decrease of tyrosine hydroxylase (TH) expression and autophagy in *substantia nigra pars compacta* (SNpc). (A) Densitometric analysis of TH protein expression in the SNpc of sham, MPTP-, PACAP38-, and MPTP + PACAP38-treated mice. (B) Digital photographs showing the expression of LC3 II and p62/SQSTM1, respectively, after immunoblotting. (C) Bar graphs displaying the relative abundance of p62/SQSTM1 measured by densitometry of the bands obtained in immunoblots, using AlphaEaseFC software (Alpha Innotech). For TH and p62/SQSTM1 expressions, values represent the relative optical density (OD) after normalization to GAPDH. All values are expressed as mean ± S.E.M. of at least three independent experiments. ***p* < 0.01 is statistically significant compared to untreated animals; ##*p* < 0.01 is statistically significant compared to MPTP-treated animals.

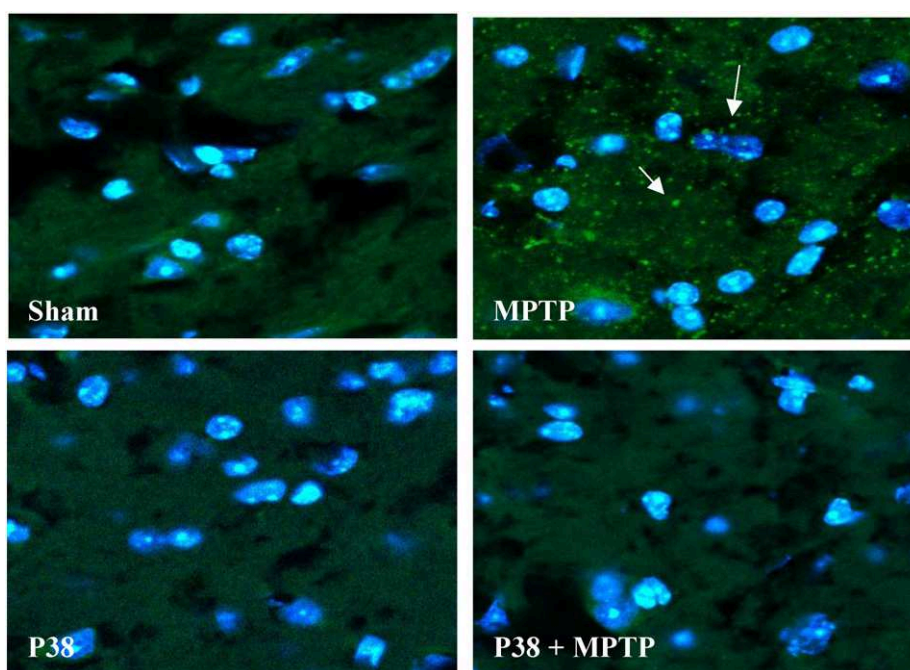


Fig. 5. Inhibitory effect of PACAP38 against the formation of MPTP-induced autophagic vacuoles in *substantia nigra pars compacta* (SNpc) of mice. Slices of SNpc were incubated with anti-LC3 (green color) and nuclei were stained with DAPI (blue color). The MPTP-treated animals showed in the DA cells the presence of many autophagic vacuoles (pointed out with white arrows). Compared to sham mice, PACAP38 itself had no effect whereas in MPTP-treated animals, the peptide prevented the formation of autophagic vacuoles.

4. Discussion

During the course of neurodegenerative processes, albeit numerous studies, cell death is the final outcome of a complex series of biological events that remain only partly understood. Accordingly, apoptosis and associated intracellular signaling have been intensively examined in various neurodegenerative diseases, including PD [54,55]. More recently, autophagy has also emerged as an important aspect of the etiology of these disorders and it has been reported that it is activated when neurons undergo aggressive stress [56–60]. There is still ongoing debate about the beneficial or detrimental outcome of autophagy activation during neurodegenerative diseases [56,57,59,61,62,22]. Nevertheless, dysregulated autophagy appears as a key element of these pathologies [11,7]. In particular, previous studies [19,20] reported an increase of the autophagic process in *in vitro* and *in vivo* PD models of neuron death induced by the toxic agents MPP⁺ and MPTP. In addition, studies using siRNAs designed for silencing genes coding for autophagic proteins such as Atg8 (to which belongs LC3), Atg7 and Atg5 protected neurons from MPP⁺-induced neurotoxicity [46,59], thereby adding evidence that the induction of the neurotoxic effect of MPP⁺ involves activation of autophagy. Hence, SH-SY5Y neuroblastoma cells, which exhibit a dopaminergic neuronal phenotype, were exposed to an acute *in vitro* stress generated by MPP⁺. The *in vitro* experiments showed that MPP⁺ treatment produced the activation of the autophagic flux in these cells, as revealed by an increased formation of LC3 II. This result is consistent with those of Nopparat et al. [18] who showed that a concentration of 1.6 mM of MPP⁺ was able to induce LC3 II accumulation and autophagosome formation in dopaminergic neurons. Also, MPP⁺ treatment induced a potent decrease of the p62 protein level, which is suggestive of a complete autophagic flux. So far, these actions are notably associated with the removal of defective mitochondria [63] and accordingly, several reports revealed that during oxidative stress, autophagy is activated to eliminate defective cell components [64,65].

PACAP has been shown to reduce toxic agent-induced neurotoxicity in PD models based on neuroblastoma cells [66,67,31,41,42]. In particular, it reduced cell death, restored the mitochondrial activity, and preserved cell integrity. However, up to now, no study has investigated

the impact of PACAP on autophagy produced following MPP⁺ or MPTP treatments used to mimic PD characteristics. Hence, we described for the first time that *in vitro*, PACAP diminished MPP⁺-induced accumulation of LC3 II, a marker of autophagy, in SH-SY5Y neuroblastoma cells. Furthermore, this led to the restoration of the p62 protein that was originally reduced by MPP⁺. These observations suggest that PACAP down-regulates MPP⁺-induced autophagy. Nonetheless, it was yet unclear if the anti-autophagic effect of the peptide was coming from a reduction of apoptosis or if PACAP was directly modulating the autophagic flux. To document this question, SH-SY5Y cells were treated with PACAP and rapamycin, a compound that activates autophagy by inhibiting mTOR. In such a condition, the peptide was able to restore significantly the level of p62, thereby confirming the inhibitory effect exerted by PACAP on autophagy. Moreover, SH-SY5Y cells transfected with GFP-LC3 demonstrated that MPP⁺ triggered the formation of autophagic vacuoles, and that this phenomenon was reversed with PACAP. Overall, our data with MPP⁺-treated SH-SY5Y cells showed that PACAP reduced cell death, maintained mitochondrial activity, diminished LC3 II formation, restored p62, and decreased autophagic vacuole formation. Based on these findings, it clearly appears that the neuroprotective peptide PACAP can modulate the autophagic process. The precise pathways regulated by PACAP to block the MPP⁺-induced autophagy are still unknown. Nevertheless, PACAP possesses the ability to stimulate cAMP production [23] and intracellular cAMP negatively regulates autophagy [68]. Moreover, studies on PACAP anti-apoptotic activity have demonstrated that following PAC1 receptor activation, a cascade of signaling events occurs, which increases Bcl-2 levels and blocks Bax expression [69]. Thus, upon PACAP treatment, the intracellular environment would favor Bcl-2/Beclin interactions that inhibit autophagy and restrain Bax translocation to lysosomes or mitochondria membranes.

In vivo studies showed that MPTP, the precursor of MPP⁺, reproduced features of PD. Accordingly, we observed that MPTP caused in mice the death of SNpc dopaminergic neurons. Neuronal loss was largely decreased when animals were injected with PACAP, and the peptide restored the expression of TH that was reduced by the neurotoxic agent. In addition, the results revealed that subchronic doses of

MPTP increased the formation of LC3 II and increased autophagosome formation in the SNpc. Surprisingly, in contrast to what was observed *in vitro*, MPTP alone did not induce the disappearance of p62, an occurrence suggesting that autophagic flux was disrupted [70]. It could be explained by the difference of paradigms (*in vitro* human neuroblastoma cells versus *in vivo* injection of MPTP in mice), as rodents show distinct sensitivity to MPTP neurotoxicity because of their particular oxidative metabolism [71]. Another explanation could be the difference in the stress duration on neurons and the way with which the cell reacted to the change. Indeed, under short stress conditions, cells activate autophagy to get rid of defective organelles. However, under prolonged stress, cells are overwhelmed with ROS and defective organelles and consequently, cell death through apoptosis probably becomes the dominant event. In fact, it has been demonstrated that prolonged stress could lead to a disruption of the autophagic flux [19]. Also, impairment of lysosomal function with disruption of the autophagic flux has been reported previously in a MPTP mice model of PD and this was directly associated with the pathogenesis of the disease because accumulation of autophagosomes in PD brain samples correlated with the presence of Lewy bodies [72]. Finally, we observed that PACAP inhibited the formation of LC3 II following a MPTP treatment and that it reduced the autophagosome formation in the SNpc.

In the context of PD, mutants of two proteins, namely PINK-1 and Parkin, have been identified in familial forms of the disease. These proteins play an essential role in the mitochondria turnover in cells. As a matter of fact, under normal physiological conditions, PINK-1 accumulates at the membrane of defective mitochondria and then Parkin is recruited to trigger selective autophagy [73]. Accordingly, mutation of these proteins gives rise to aberrant mitophagy. Moreover, abnormal expression of α -synuclein, which is a main component of Lewy bodies that are a pathological trait of PD, has been linked to increased autophagy while mutated forms of the protein have been found to co-localize within autophagosomes containing normal polarized mitochondria [57]. Altogether, it seems that cells affected by the pathology will increasingly suffer from a loss of mitochondrial function. In this point of view, treatment with PACAP could offer protection against increased autophagic and apoptotic mechanisms. Furthermore, a recent study has demonstrated that PACAP was able to up-regulate expression levels of Pgc1 α , a transcriptional regulator of mitochondrial biogenesis [74]. Thus, treated cells would not only benefit from blockade of the cell death process but also from renewal of mitochondria.

In conclusion, we showed that PACAP, a neuropeptide known for its anti-apoptotic properties, could also negatively modulate MPP⁺- and MPTP-induced autophagy. These findings provide additional information regarding the link between apoptosis and autophagy and highlight that PACAP exerts its potent neuroprotective activity through diverse complementary pathways. Nevertheless, further studies are required to deeper dissect the relationship between neuroprotection and inhibition of autophagy produced with PACAP.

Conflict of interest

No conflict of interest is reported.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in the online version.

Acknowledgments

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research—FRN102734 (A.F.) and the Interreg IVA PeReNE (#4230) project (D.V.). D.V. is affiliated professor at the Institut National de la Recherche Scientifique—Institut Armand-Frappier. A.M.F. is supported by a doctoral scholarship from the National CIHR Research Training

Program in Hepatitis C. A.F. and D.V. co-supervise A.L.-A. within a France – Quebec thesis co-supervision agreement.

References

- [1] M.E. Mahler, J.L. Cummings, Alzheimer disease and the dementia of Parkinson disease: comparative investigations, *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 4 (3) (1990) 133–149.
- [2] M.B. Shenai, A. Romeo, H.C. Walker, S. Guthrie, R.L. Watts, B.L. Guthrie, Spatial topographies of unilateral subthalamic nucleus deep brain stimulation efficacy for ipsilateral, contralateral, midline, and total Parkinson disease motor symptoms, *Neurosurgery* 11 (Suppl. 2) (2015) 80–88, <http://dx.doi.org/10.1227/NEU.0000000000000613> (discussion 8).
- [3] F. Mori, M. Nishie, A. Kakita, M. Yoshimoto, H. Takahashi, K. Wakabayashi, Relationship among alpha-synuclein accumulation, dopamine synthesis, and neurodegeneration in Parkinson disease substantia nigra, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65 (8) (2006) 808–815, <http://dx.doi.org/10.1097/01.jnen.0000230520.47768.1a>.
- [4] C. Monti, H. Bondi, A. Urbani, M. Fasano, T. Alberio, Systems biology analysis of the proteomic alterations induced by MPP⁺, a Parkinson's disease-related mitochondrial toxin, *Front. Cell. Neurosci.* 9 (2015) 14, <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2015.00014>.
- [5] W.D. Parker Jr., R.H. Swerdlow, Mitochondrial dysfunction in idiopathic Parkinson disease, *Am. J. Hum. Genet.* 62 (4) (1998) 758–762, <http://dx.doi.org/10.1086/301812>.
- [6] C. Tranchant, C. Weess, J.M. Warter, Idiopathic Parkinson disease and mitochondrial functions, *Rev. Neurol. (Paris)* 151 (3) (1995) 157–160.
- [7] K. Hensley, M.E. Harris-White, Redox regulation of autophagy in healthy brain and neurodegeneration, *Neurobiol. Dis.* (2015) <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2015.03.002>.
- [8] M. Ruberg, V. France-Lanord, B. Brugg, N. Lambeng, P.P. Michel, P. Anglade, et al., Neuronal death caused by apoptosis in Parkinson disease, *Rev. Neurol. (Paris)* 153 (8–9) (1997) 499–508.
- [9] R.P. Ureshino, K.K. Rocha, G.S. Lopes, C. Bincoletto, S.S. Smaili, Calcium signaling alterations, oxidative stress, and autophagy in aging, *Antioxid. Redox Signal.* 21 (1) (2014) 123–137, <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2013.5777>.
- [10] T. Yoshimori, Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313 (2) (2004) 453–458.
- [11] D.S. Arroyo, E.A. Gaviglio, J.M. Peralta Ramos, C. Bussi, M.C. Rodriguez-Galan, P. Iribarren, Autophagy in inflammation, infection, neurodegeneration and cancer, *Int. Immunopharmacol.* 18 (1) (2014) 55–65, <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2013.11.001>.
- [12] H. Harris, D.C. Rubinsztein, Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease, *Nat. Rev. Neurol.* 8 (2) (2012) 108–117, <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2011.200>.
- [13] W.E. Hochfeld, S. Lee, D.C. Rubinsztein, Therapeutic induction of autophagy to modulate neurodegenerative disease progression, *Acta Pharmacol. Sin.* 34 (5) (2013) 600–604, <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2012.189>.
- [14] S. Giordano, V. Darley-Usmar, J. Zhang, Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease, *Redox Biol.* 2 (2014) 82–90, <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.013>.
- [15] S.J. Cherra 3rd, C.T. Chu, Autophagy in neuroprotection and neurodegeneration: a question of balance, *Future Neurol.* 3 (3) (2008) 309–323, <http://dx.doi.org/10.2217/14796708.3.3.309>.
- [16] Y.D. Wen, R. Sheng, L.S. Zhang, R. Han, X. Zhang, X.D. Zhang, et al., Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways, *Autophagy* 4 (6) (2008) 762–769.
- [17] Z.Q. Wang, Y. Yang, T. Lu, P. Luo, J. Li, J.P. Wu, et al., Protective effect of autophagy inhibition on ischemia-reperfusion-induced injury of N2a cells, *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 33 (6) (2013) 810–816, <http://dx.doi.org/10.1007/s11596-013-1203-y>.
- [18] C. Nopparat, J.E. Porter, M. Ebadi, P. Govitrapong, 1-Methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death via autophagy through a Bcl-2/beclin 1 complex-dependent pathway, *Neurochem. Res.* 39 (2) (2014) 225–232, <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-013-1208-8>.
- [19] K.C. Hung, H.J. Huang, M.W. Lin, Y.P. Lei, A.M. Lin, Roles of autophagy in MPP⁺-induced neurotoxicity in vivo: the involvement of mitochondria and alpha-synuclein aggregation, *PLoS ONE* 9 (3) (2014), e91074, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0091074>.
- [20] J. Lim, Y. Lee, S. Jung, M.B. Youdim, Y.J. Oh, Impaired autophagic flux is critically involved in drug-induced dopaminergic neuronal death, *Parkinsonism Relat. Disord.* 20 (Suppl. 1) (2014) S162–S166, [http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020\(13\)70039-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020(13)70039-7).
- [21] C. Nopparat, J.E. Porter, M. Ebadi, P. Govitrapong, The mechanism for the neuroprotective effect of melatonin against methamphetamine-induced autophagy, *J. Pineal Res.* 49 (4) (2010) 382–389, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00805.x>.
- [22] H. Zhou, J. Chen, X. Lu, C. Shen, J. Zeng, L. Chen, et al., Melatonin protects against rotenone-induced cell injury via inhibition of Omi and Bax-mediated autophagy in Hela cells, *J. Pineal Res.* 52 (1) (2012) 120–127, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00926.x>.
- [23] D. Vaudry, B.J. Gonzalez, M. Basille, L. Yon, A. Fournier, H. Vaudry, Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions, *Pharmacol. Rev.* 52 (2) (2000) 269–324.
- [24] D. Reglodi, P. Kiss, A. Lubics, A. Tamas, Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases *in vitro* and *in vivo*, *Curr. Pharm. Des.* 17 (10) (2011) 962–972.
- [25] D. Reglodi, A. Tamas, I. Lengvari, G. Toth, L. Szalontay, A. Lubics, Comparative study of the effects of PACAP in young, aging, and castrated males in a rat model of

- Parkinson's disease, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1070 (2006) 518–524, <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1317.072>.
- [26] K.Y. Shivers, A. Nikolopoulou, S.I. Machlivi, S. Vallabhajosula, M.E. Figueiredo-Pereira, PACAP27 prevents Parkinson-like neuronal loss and motor deficits but not microglia activation induced by prostaglandin J2, *Biochim. Biophys. Acta* 1842 (9) (2014) 1707–1719, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.020>.
- [27] D. Vaudry, A. Falluel-Morel, S. Bourgault, M. Basille, D. Burel, O. Wurtz, et al., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery, *Pharmacol. Rev.* 61 (3) (2009) 283–357, <http://dx.doi.org/10.1124/pr.109.001370>.
- [28] M. Delgado, G.M. Jonakait, D. Ganea, Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit chemokine production in activated microglia, *Glia* 39 (2) (2002) 148–161, <http://dx.doi.org/10.1002/glia.10098>.
- [29] D.L. Kellogg Jr., J.L. Zhao, Y. Wu, J.M. Johnson, Nitric oxide and receptors for VIP and PACAP in cutaneous active vasodilation during heat stress in humans, *J. Appl. Physiol.* (1985) 113 (10) (2012) 1512–1518, <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.00859.2012>.
- [30] D. Vaudry, T.F. Pamantung, M. Basille, C. Rousselle, A. Fournier, H. Vaudry, et al., PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis, *Eur. J. Neurosci.* 15 (9) (2002) 1451–1460.
- [31] J. Deguil, D. Jailloux, G. Page, B. Fauconneau, J.L. Houeto, M. Philippe, et al., Neuroprotective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in MPP + -induced alteration of translational control in neuro-2a neuroblastoma cells, *J. Neurosci. Res.* 85 (9) (2007) 2017–2025, <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.21318>.
- [32] P. Lazarovici, G. Cohen, H. Arieni-Zakay, J. Chen, C. Zhang, M. Chopp, et al., Multimodal neuroprotection induced by PACAP38 in oxygen–glucose deprivation and middle cerebral artery occlusion stroke models, *J. Mol. Neurosci.* 48 (3) (2012) 526–540, <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-012-9818-1>.
- [33] D. Rat, U. Schmitt, F. Tippmann, I. Dewachter, C. Theunis, E. Wiczerzak, et al., Neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) slows down Alzheimer's disease-like pathology in amyloid precursor protein-transgenic mice, *FASEB J.* 25 (9) (2011) 3208–3218, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.10-180133>.
- [34] A. Tamas, D. Reglodi, O. Farkas, E. Kovessi, J. Pal, J.T. Povlishock, et al., Effect of PACAP in central and peripheral nerve injuries, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (7) (2012) 8430–8448, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms13078430>.
- [35] C.Y. Chung, H. Seo, K.C. Sonntag, A. Brooks, L. Lin, O. Isacson, Cell type-specific gene expression of midbrain dopaminergic neurons reveals molecules involved in their vulnerability and protection, *Hum. Mol. Genet.* 14 (13) (2005) 1709–1725, <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddi178>.
- [36] M. Delgado, Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit CBP-NF-kappaB interaction in activated microglia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297 (5) (2002) 1181–1185.
- [37] K. Dohi, H. Mizushima, S. Nakajo, H. Ohtaki, S. Matsunaga, T. Aruga, et al., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevents hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways, *Regul. Pept.* 109 (1–3) (2002) 83–88, [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-0115\(02\)00190-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-0115(02)00190-8) (Pii: S0167-0115(02)00190-8).
- [38] A. Falluel-Morel, N. Aubert, D. Vaudry, M. Basille, M. Fontaine, A. Fournier, et al., Opposite regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by C2-ceramide and PACAP through a MAP-kinase-dependent mechanism in cerebellar granule cells, *J. Neurochem.* 91 (5) (2004) 1231–1243, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02810.x>.
- [39] H. Ohtaki, T. Nakamachi, K. Dohi, Y. Aizawa, A. Takaki, K. Hodoyama, et al., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (19) (2006) 7488–7493, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0600375103>.
- [40] D. Vaudry, C. Rousselle, M. Basille, A. Falluel-Morel, T.F. Pamantung, M. Fontaine, et al., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (9) (2002) 6398–6403, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.082112699>.
- [41] N.D. Doan, S. Bourgault, A. Dejada, M. Letourneau, M. Dethieux, D. Vaudry, et al., Design and in vitro characterization of PAC1/VPAC1-selective agonists with potent neuroprotective effects, *Biochem. Pharmacol.* 81 (4) (2011) 552–561, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2010.11.015>.
- [42] A. Lamine, M. Letourneau, N.D. Doan, J. Maucotel, A. Couvineau, H. Vaudry, et al., Characterizations of a synthetic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide analog displaying potent neuroprotective activity and reduced in vivo cardiovascular side effects in a Parkinson's disease model, *Neuropharmacology* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.014>.
- [43] D. Cartelli, C. Ronchi, M.G. Maggioni, S. Rodighiero, E. Giavini, G. Cappelletti, Microtubule dysfunction precedes transport impairment and mitochondrial damage in MPP + -induced neurodegeneration, *J. Neurochem.* 115 (1) (2010) 247–258, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06924.x>.
- [44] R.R. Ramsay, J.I. Salach, T.P. Singer, Uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP +) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD + -linked substrates by MPP + , *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134 (2) (1986) 743–748.
- [45] Y.W. Tzeng, L.Y. Lee, P.L. Chao, H.C. Lee, R.T. Wu, A.M. Lin, Role of autophagy in protection afforded by hypoxic preconditioning against MPP + -induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (5) (2010) 839–846, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.004>.
- [46] J.H. Zhu, C. Horbinski, F. Guo, S. Watkins, Y. Uchiyama, C.T. Chu, Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death, *Am. J. Pathol.* 170 (1) (2007) 75–86, <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2007.060524>.
- [47] H. Wang, Y. Ye, Z. Zhu, L. Mo, C. Lin, Q. Wang, et al., MiR-124 regulates apoptosis and autophagy process in MPTP model of Parkinson's disease by targeting to Bim, *Brain Pathol.* (2015) <http://dx.doi.org/10.1111/bpa.12267>.
- [48] S.J. Cherra 3rd, S.M. Kulich, G. Uechi, M. Balasubramani, J. Mountzouris, B.W. Day, et al., Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation, *J. Cell Biol.* 190 (4) (2010) 533–539, <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201002108>.
- [49] S. Bourgault, D. Vaudry, J. Segalas-Milazzo, L. Guilhaudis, A. Couvineau, M. Laborthe, et al., Molecular and conformational determinants of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) for activation of the PAC1 receptor, *J. Med. Chem.* 52 (10) (2009) 3308–3316, <http://dx.doi.org/10.1021/jm900291j>.
- [50] E.M. Lutz, E. Ronaldson, P. Shaw, M.S. Johnson, P.J. Holland, R. Mitchell, Characterization of novel splice variants of the PAC1 receptor in human neuroblastoma cells: consequences for signaling by VIP and PACAP, *Mol. Cell. Neurosci.* 31 (2) (2006) 193–209, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2005.09.008>.
- [51] J. Deguil, F. Chavant, C. Lafay-Chebassier, M.C. Perault-Pochat, B. Fauconneau, S. Pain, Neuroprotective effect of PACAP on translational control alteration and cognitive decline in MPTP parkinsonian mice, *Neurotox. Res.* 17 (2) (2010) 142–155, <http://dx.doi.org/10.1007/s12640-009-9091-4>.
- [52] R. Banerjee, S. Sreetama, K.S. Saravanan, S.N. Dey, K.P. Mohanakumar, Apoptotic mode of cell death in substantia nigra following intranigral infusion of the parkinsonian neurotoxin, MPP + in Sprague–Dawley rats: cellular, molecular and ultrastructural evidences, *Neurochem. Res.* 32 (7) (2007) 1238–1247, <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-007-9299-8>.
- [53] A. Fragkouli, E. Doxakis, miR-7 and miR-153 protect neurons against MPP (+)-induced cell death via upregulation of mTOR pathway, *Front. Cell. Neurosci.* 8 (2014) 182, <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2014.00182>.
- [54] E. Radi, P. Formichi, C. Battisti, A. Federico, Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases, *J. Alzheimers Dis.* 42 (Suppl. 3) (2014) S125–S152, <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-132738>.
- [55] A.H. Schapira, C.W. Olanow, J.T. Greenamyre, E. Bezdard, Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives, *Lancet* 384 (9942) (2014) 545–555, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61010-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61010-2).
- [56] P. Anglade, S. Vyas, F. Javoy-Agid, M.T. Herrero, P.P. Michel, J. Marquez, et al., Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease, *Histol. Histopathol.* 12 (1) (1997) 25–31.
- [57] M.A. Lynch-Day, K. Mao, K. Wang, M. Zhao, D.J. Klionsky, The role of autophagy in Parkinson's disease, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2 (4) (2012) a009357, <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a009357>.
- [58] M. Martinez-Vicente, Autophagy in neurodegenerative diseases: from pathogenic dysfunction to therapeutic modulation, *Semin. Cell Dev. Biol.* 40 (2015) 115–126, <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.03.005>.
- [59] A.S. Wong, R.H. Lee, A.Y. Cheung, P.K. Yeung, S.K. Chung, Z.H. Cheung, et al., Cdk5-mediated phosphorylation of endophilin B1 is required for induced autophagy in models of parkinson's disease, *Nat. Cell Biol.* 13 (5) (2011) 568–579, <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2217>.
- [60] J.H. Zhu, F. Guo, J. Shelburne, S. Watkins, C.T. Chu, Localization of phosphorylated ERK/MAP kinases to mitochondria and autophagosomes in Lewy body diseases, *Brain Pathol.* 13 (4) (2003) 473–481.
- [61] Q. Yang, Z. Mao, Parkinson disease: a role for autophagy? *Neuroscientist* 16 (4) (2010) 335–341, <http://dx.doi.org/10.1177/1073858409357118>.
- [62] Y. Zheng, J. Hou, J. Liu, M. Yao, L. Li, B. Zhang, et al., Inhibition of autophagy contributes to melatonin-mediated neuroprotection against transient focal cerebral ischemia in rats, *J. Pharmacol. Sci.* 124 (3) (2014) 354–364.
- [63] N. Xiong, J. Xiong, M. Jia, L. Liu, X. Zhang, Z. Chen, et al., The role of autophagy in Parkinson's disease: rotenone-based modeling, *Behav. Brain Funct.* 9 (2013) 13, <http://dx.doi.org/10.1186/1744-9081-9-13>.
- [64] R. Kiffin, U. Bandyopadhyay, A.M. Cuervo, Oxidative stress and autophagy, *Antioxid. Redox Signal.* 8 (1–2) (2006) 152–162, <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2006.8.152>.
- [65] J. Lee, S. Giordano, J.H. Zhang, Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling, *Biochem. J.* 441 (2012) 523–540, <http://dx.doi.org/10.1042/Bj20111451>.
- [66] D. Brown, A. Tamas, D. Reglodi, Y. Tizabi, PACAP protects against salinsol-induced toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells: implication for Parkinson's disease, *J. Mol. Neurosci.* 50 (3) (2013) 600–607, <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-013-0015-7>.
- [67] D. Brown, A. Tamas, D. Reglodi, Y. Tizabi, PACAP protects against inflammatory-mediated toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells: implication for Parkinson's disease, *Neurotox. Res.* 26 (3) (2014) 230–239, <http://dx.doi.org/10.1007/s12640-014-9468-x>.
- [68] B. Ravikumar, S. Sarkar, J.E. Davies, M. Futter, M. Garcia-Arencibia, Z.W. Green-Thompson, et al., Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology, *Physiol. Rev.* 90 (4) (2010) 1383–1435, <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00030.2009>.
- [69] T. Seaborn, O. Masmoudi-Kouli, A. Fournier, H. Vaudry, D. Vaudry, Protective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) against apoptosis, *Curr. Pharm. Des.* 17 (3) (2011) 204–214.
- [70] G. Bjorkoy, T. Lamark, S. Pankiv, A. Overvatn, A. Brech, T. Johansen, Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1, *Methods Enzymol.* 452 (2009) 181–197, [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)03612-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03612-4).
- [71] J.N. Johannessen, C.C. Chiueh, R.S. Burns, S.P. Markey, Differences in the metabolism of MPTP in the rodent and primate parallel differences in sensitivity to its neurotoxic effects, *Life Sci.* 36 (3) (1985) 219–224.
- [72] B. Dehay, J. Bove, N. Rodriguez-Muela, C. Perier, A. Recasens, P. Boya, et al., Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease, *J. Neurosci.* 30 (37) (2010) 12535–12544, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1920-10.2010>.
- [73] A.M. Pickrell, R.J. Youle, The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease, *Neuron* 85 (2) (2015) 257–273, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.007>.
- [74] Y. Kambe, A. Miyata, Role of mitochondrial activation in PACAP-dependent neurite outgrowth, *J. Mol. Neurosci.* 48 (3) (2012) 550–557, <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-012-9754-0>.

Discussion

“ Si chaque découverte entraîne plus de questions qu'elle n'en résout, la part d'inconnu s'accroît à mesure que nos connaissances augmentent.

Pierre Vathomme

Chapitre 4 : Discussion

La maladie de Parkinson, un trouble neurodégénératif invalidant, est responsable d'handicaps considérables et ultimement du décès chez les patients atteints de cette pathologie. Ces derniers présentent sur le plan clinique, des troubles moteurs et cognitifs en raison de la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la SN (Chan-Palay, 1991). À ce jour, il n'existe aucun traitement curatif contre la MP; toutes les thérapies existantes n'étant que palliatives et ne pouvant ni ralentir, ni freiner la progression de la maladie (Athauda et al., 2015). De nombreuses études ont rapporté que la dégénérescence des neurones dopaminergiques observée au cours de la MP est causée notamment par l'altération des fonctions mitochondriales (Monti et al., 2015, Parker et al., 1998, Tranchant et al., 1995), et que celle-ci s'avère associée en grande partie à un processus apoptotique (Perier et al., 2012). D'autres travaux ont toutefois aussi lié cette neurodégénérescence à un dérèglement du processus autophagique (Janda et al., 2012, Lynch-Day et al., 2012, B. Wang et al., 2016a). Par ailleurs, il a été montré que ces deux types de mort neuronale peuvent aussi être induits par des événements oxydatifs et inflammatoires (Emerit et al., 2004, Friedlander, 2003, Janda et al., 2012, Wilms et al., 2007). De ce fait, certains agents neuroprotecteurs et modulateurs de l'inflammation ont été développés et quelques-uns ont même été évalués cliniquement (Athauda et al., 2015). En raison de la haute sélectivité moléculaire de la BHE et du caractère multifactoriel de la MP, les résultats demeurent toutefois insatisfaisants. Dans ce contexte, puisqu'il est pourvu d'une capacité à traverser la BHE et qu'il est doté d'effets antiapoptotiques, anti-inflammatoires et antioxydants, le PACAP s'annonce prometteur pour le développement d'une stratégie thérapeutique curative ou préventive des maladies neurodégénératives telles que la MP (Nishimoto et al., 2007, Ravni et al., 2006, Reglodi et al., 2004a, Shioda et al., 2006). De plus, comme discuté dans la littérature (section 2.5.1), l'expression constitutive du PACAP au niveau des neurones dopaminergiques de la population A10 (impliquée dans l'émotion) favorise leur résistance aux processus neurodégénératifs, comparé à ceux de la population A9 (impliquée dans la motricité). En effet, ces derniers dégènèrent préférentiellement au cours de la MP ou face à des agents neurotoxiques, du fait de l'absence de l'expression de certaines substances à caractère neuroprotecteur dont principalement le PACAP (C. Y. Chung et al., 2005a). Ainsi, la

présence du peptide et de ses récepteurs au niveau de la SN ainsi que l'implication de sa forme endogène dans la prévention de la dégénérescence des neurones dopaminergiques et du processus pro-inflammatoire causés par le paraquat (agent neurotoxique mimant in vivo la MP) renforcent donc l'utilisation du PACAP comme un gabarit moléculaire efficace pour le développement d'agents thérapeutiques pour la MP (Watson et al., 2013).

En effet, il a été montré que le PACAP exerce un ensemble d'effets neuroprotecteurs dans plusieurs modèles expérimentaux d'atteintes neurodégénératives, incluant les AVC et les lésions cérébrales (Deguil et al., 2007, Lazarovici et al., 2012, E. H. Lee et al., 2014a, Rat et al., 2011, Reglodi et al., 2011, Tamas et al., 2012). Bien que son effet sur la mort autophagique observée au cours de la MP n'ait jamais été étudié, les diverses actions biologiques du PACAP, incluant la modulation des voies de neurotransmission dopaminergiques et cholinergiques intracérébrales, permettent de le considérer aujourd'hui comme une molécule neuroprotectrice efficace vis-à-vis de plusieurs modèles cellulaires et animaux de la MP (Brown et al., 2013, Brown et al., 2014, Reglodi et al., 2004b, Shivers et al., 2014, G. Wang et al., 2008a). Toutefois, l'existence de certaines limitations au niveau pharmacocinétique et pharmacologique empêche actuellement l'utilisation clinique de ce peptide comme stratégie thérapeutique.

En particulier, dans le plasma humain, ce peptide présente une faible stabilité métabolique avec une demi-vie < 5 min (Bourgault et al., 2008a). En effet, une fois injecté en iv chez l'humain, le PACAP est rapidement dégradé par la DPP IV, une enzyme qui convertit le PACAP38 en PACAP(3-38) puis en PACAP(5-38). Cette situation est doublement contrariante car non seulement l'activité biologique est perdue mais en plus ces deux fragments se comportent comme des antagonistes du peptide natif. En outre, par le biais d'outils pharmacologiques et d'animaux transgéniques, trois récepteurs distincts couplés à la protéine G ont été identifiés pour le PACAP, à savoir PAC1, VPAC1 et VPAC2, et ils sont bien sûr à l'origine des différents effets de la molécule (Vaudry et al., 2009, Vaudry et al., 2000b). Les activités antiapoptotiques reposent principalement sur le récepteur PAC1, tandis que les activités anti-inflammatoires sont plutôt médiées par VPAC1 (Delgado et al., 2002, Kellogg et al., 2012, Vaudry et al., 2002a). Quant au

récepteur VPAC2, son activation génère diverses actions périphériques tant chez plusieurs espèces animales que chez l'homme. D'un point de vue pharmacologique, certains effets apparaissent comme indésirables dans un contexte thérapeutique tels que la rétention d'eau, la vasodilatation, l'hypotension et l'élévation de la fréquence cardiaque (Ishizuka et al., 1992, Nandha et al., 1991, Tsutsumi et al., 2002, Warren et al., 1992). Ainsi, la conception d'analogues stables du PACAP, capables d'activer seulement le récepteur PAC1 (antiapoptotique), ou simultanément PAC1 et VPAC1 (anti-inflammatoire), est d'un intérêt manifeste. C'est dans cette perspective que notre équipe a développé un dérivé du PACAP dans lequel un groupe acétyle a été attaché à la fonction amine de l'extrémité N-terminale dans le but d'améliorer la stabilité métabolique du peptide (Bourgault et al., 2008a). Aussi, le résidu méthionine situé en position 17 a été substitué par son isostère, la norleucine, pour éviter toute oxydation du peptide. En accord avec nos résultats et certaines informations recueillies dans la littérature, les deux modifications introduites au niveau du peptide n'affectent pas l'activité biologique du peptide (Bourgault et al., 2009a). Enfin, avec son caractère hydrophobe marqué, un atome d'iode a été introduit au niveau du carbone en position para du cycle aromatique du résidu phénylalanine-6, ce qui a renforcé l'hydrophobicité et l'entrave stérique existant à cette position (Bourgault et al., 2009b). Ces caractéristiques s'avèrent déterminantes pour la reconnaissance des récepteurs PAC1 et VPAC1 par le PACAP. Donc, en fonction des paramètres physicochimiques souhaités afin de répondre aux attentes de stabilité, d'activité et de sélectivité, notre équipe a conçu l'Ac-[Phe(PI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27).

Deux volets ont été explorés dans le cadre de cette thèse. Le premier avait comme objectif la caractérisation pharmacologique de l'analogue synthétique et l'investigation de ses activités biologiques dans des modèles cellulaires et animaux de la MP. Ainsi, nous avons initialement testé la sélectivité de l'Ac-[Phe(PI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) envers les récepteurs du PACAP, et ce, au moyen de tests de liaison sur des lignées cellulaires transfectées de manière stable avec les récepteurs PAC1, VPAC1 ou VPAC2. Ensuite, d'une part, nous avons vérifié l'efficacité de notre molécule à contrer les effets délétères des agents neurotoxiques MPP⁺ et MPTP, lesquels reproduisent respectivement la MP in vitro et in vivo, et d'autre part, nous avons comparé l'activité de l'Ac-[Phe(PI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) à celle du PACAP sur la PAM et la fréquence cardiaque, des

paramètres biologiques associés à l'activation du récepteur VPAC2. Finalement, dans le deuxième volet, nous avons étudié l'effet du PACAP sur la mort autophagique observée au cours de cette pathologie, et ce, dans les mêmes conditions que celles appliquées au cours de la première étude. Cette seconde étape nous a permis de révéler de façon non équivoque l'effet qu'exerce le PACAP sur le processus autophagique activé au cours de la MP.

1. Caractérisation pharmacologique de l'Ac-[Phe(PI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) et étude de l'impact des modifications introduites sur des modèles de la MP

Comme mentionné précédemment, des études de type structure-activité effectuées par notre équipe ont permis la conception d'une librairie de dérivés du PACAP utiles pour identifier les pharmacophores du peptide jouant un rôle dominant pour son affinité et son activité. Ainsi, l'importance extrême du segment N-terminal du PACAP dans l'activité et la sélectivité vis-à-vis de ses récepteurs a été mise en évidence et conséquemment, cette portion de la molécule a été ciblée pour y introduire deux modifications chimiques visant à augmenter la stabilité métabolique du peptide et à améliorer sa sélectivité. Ainsi, en accord avec les données de la littérature, l'introduction d'un groupement acétyle au niveau de l'extrémité N-terminale de la forme courte du PACAP (PACAP27) a considérablement rehaussé la stabilité de ce peptide vis-à-vis la DPP IV, une enzyme membranaire (Bourgault et al., 2008a). Également, nous avons démontré qu'au niveau du plasma humain, notre dérivé de synthèse l'Ac-[Phe(PI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) présente une stabilité remarquable, avec une demi-vie dépassant 2 h, comparativement à celle du PACAP27 qui est de l'ordre d'une quinzaine de minutes et à celle du PACAP38 qui est de moins de 5 min. Cette modification représente donc une stratégie pertinente à appliquer dans le cadre du développement d'une molécule peptidique stable dérivée du PACAP. Par ailleurs, Laburthe et coll. avaient rapporté que la structure du VIP, un peptide membre de la superfamille PACAP/sécrétine/glucagon est maintenue par une interaction hydrophobe à laquelle participent les résidus phénylalanine-6 et tyrosine-10, ainsi que par un pont hydrogène reliant les deux résidus thréonine des positions 7 et 11 (J. M. Neumann et al., 2008). De ce fait, il a été suggéré que des interactions semblables sont également présentes dans le PACAP (J. M. Neumann et al., 2008). À ce niveau, à la suite d'un ensemble de modifications chimiques telles que le remplacement de Phe-6 par

divers résidus incluant la tyrosine (Tyr), la naphtylalanine (Nal) et l'alanine (Ala), Fournier et coll. ont suggéré que l'encombrement stérique formé par les résidus Phe-6, Tyr-7 et Tyr-10, ainsi que l'hydrophobicité du résidu Phe lui-même, sont essentiels à la reconnaissance du PACAP par ses récepteurs (Doan et al., 2011). Ces paramètres ont pu être amplifiés par l'introduction en position para du résidu Phe-6 d'un atome d'iode, un halogène volumineux et hydrophobe. Nos résultats des tests pour l'AMPc effectués sur des cellules CHO transfectées avec PAC1 ont montré que l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) active efficacement la production d'AMPc et que cette action se traduit (aspect discuté subséquemment) par des effets neuroprotecteurs très significatifs. Finalement, une troisième modification a été incorporée dans l'analogue, soit le remplacement de la méthionine en position 17 par un isostère, la norleucine. Comme mentionné précédemment, cette substitution permet de prévenir l'oxydation du peptide, ce qui facilite la synthèse du composé et lui confère une stabilité chimique accrue lorsqu'il est en solution.

Afin d'étudier l'effet de l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) sur un modèle *in vitro* de la MP, nous avons utilisé comme modèle de neurodégénérescence, les cellules de neuroblastomes humains SH-5YSY. Étant largement utilisées comme modèle cellulaire de la MP, ces cellules présentent l'avantage précieux d'exprimer la tyrosine hydroxylase et le DAT, deux caractéristiques dominantes des neurones dopaminergiques (Lopes et al., 2010, Presgraves et al., 2004, Xie et al., 2010). Nos données ont montré qu'un prétraitement de 4 h avec le PACAP38, le PACAP27 ou l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) protège significativement les cellules SH-SY5Y contre la neurotoxicité induite par le MPP⁺. En revanche, le VIP est incapable de prévenir cette mort neuronale, ce qui suggère l'implication du récepteur PAC1 dans le processus de neuroprotection puisque les cellules SH-SY5Y n'expriment que les récepteurs PAC1 et VPAC2. De plus, en accord avec nos résultats des tests de production d'AMPc, le VIP a été incapable de stimuler la formation d'AMPc dans ce même modèle cellulaire. Il faut cependant signaler que Mitchell et coll. ont démontré que les cellules SH-SY5Y peuvent produire de l'AMPc en présence de VIP et, selon leur conclusion, cette action serait médiée par le récepteur PAC1 (Lutz et al., 2006). Une explication a été fournie par la démonstration que la production d'AMPc par le VIP est liée au type de variants du récepteur PAC1 exprimé dans les cellules de

neuroblastomes humains tels hPAC_{1-δ4,5,6null} et hPAC_{1-δ5hop} (Lutz et al., 2006). Malgré cette disparité, nos observations sont en accord avec les résultats de Pain et coll. qui ont mis en évidence un effet neuroprotecteur pour le PACAP mais pas pour le VIP face à l'altération du contrôle traductionnel induit par le MPP⁺ dans les cellules Neuro 2a (Deguil et al., 2007). De même, nos résultats concordent avec ceux de Seaborn et al. qui ont démontré que la neuroprotection induite par le PACAP est médiée par l'activation du PAC1 et qu'elle fait appel à la stimulation de la production d'AMPC et à l'activation de PKA (Seaborn et al., 2011a). Certaines études ont mis en évidence une action protectrice du VIP dans des modèles expérimentaux de neurodégénérescence, ce qui a amené les auteurs à suggérer que cet effet est médié par le récepteur VPAC1 et non pas PAC1 (Delgado et al., 2003a). En particulier, il semble que cette activité provienne des propriétés immunomodulatrices du VIP impliquant des voies dépendantes et indépendantes de l'AMPC, et qui sont associées à l'inhibition des cytokines pro-inflammatoires et à la régulation de la chimiotaxie dans les cellules microgliales (Waschek, 2013).

Il a été fréquemment rapporté que le dysfonctionnement mitochondrial constitue une composante clé dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives, et particulièrement de la MP. Comme indiqué auparavant, celui-ci joue un rôle causal dans la pathogénie de cette pathologie (Valadas et al., 2015). C'est dans ce contexte que nous avons exploré la capacité des isoformes du PACAP et de l'analogue Ac-[Phe(p)]⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) à atténuer l'altération du potentiel membranaire mitochondrial induite par le MPP⁺. Au cours de nos travaux effectués *in vitro*, des prétraitements avec le PACAP ou l'analogue ont été utilisés dans le modèle cellulaire afin d'obtenir des informations sur l'efficacité des peptides à prévenir la mort neuronale dans des conditions de neurotoxicité. De fait, il a été montré que des prétraitements avec le PACAP, de même que des traitements en simultané avec l'agression toxique, permettent de réduire significativement la vulnérabilité des cellules SH-SY5Y face à divers agents neurotoxiques, incluant le MPP⁺ (Brown et al., 2013, Brown et al., 2014, Doan et al., 2011, Vaudry et al., 2009).

Divers agents neurotoxiques ont été utilisés *in vivo* pour reproduire la MP, notamment la roténone, la 6-OHDA et le paraquat (Blesa et al., 2014). Toutefois, au cours

de nos travaux menés *in vivo*, nous avons privilégié le MPTP afin d'étudier l'efficacité des peptides vis-à-vis de certains événements délétères survenant suite de l'administration de cet agent neurotoxique à des souris. Le MPTP apparaît comme une substance efficace dans la reproduction chez les humains, les singes et les souris d'un syndrome très proche de la MP (Langston et al., 1984). En réalité, une administration subchronique de MPTP chez le singe, ou encore chez la souris, induit 50% de perte des neurones dopaminergiques, ce qui se traduit, entre autres, par une baisse considérable de l'expression de la TH, une enzyme intervenant dans le métabolisme des catécholamines et un marqueur de ces mêmes neurones, et l'apparition concomitante de troubles du mouvement apparentés à ceux observés chez les patients parkinsoniens (Deguil et al., 2010). Outre ces effets, le MPTP induit efficacement des mécanismes de mort neuronale semblables à ceux observés au cours de la pathogenèse de la MP, telles l'apparition de corps de Lewy, la présence de vacuoles autophagiques, la régulation à la hausse des cytokines pro-inflammatoires et l'activation de la caspase-3 (Forno et al., 1988, Ojha et al., 2012, Pisanu et al., 2014, L. Y. Su et al., 2015, Turmel et al., 2001, Y. D. Xu et al., 2017, Yokoyama et al., 2008). De ce fait, nous avons observé chez les souris traitées avec le MPTP qu'il y a une perte significative des neurones dopaminergiques et une augmentation des taux des ARNm codant pour la caspase-3 et les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-6). Nos résultats concordent avec ceux des études décrites précédemment (Pisanu et al., 2014, Turmel et al., 2001) et soutiennent le fait que le MPTP génère un modèle *in vivo* approprié pour l'étude de la MP. Au cours de notre étude *in vitro*, le PACAP38 est apparu plus efficace que le PACAP27 en termes de neuroprotection. Par conséquent, dans notre étude *in vivo*, seule l'isoforme de 38 acides aminés du PACAP (PACAP38) a été utilisée comme contrôle positif de neuroprotection. Dans ce contexte, il avait été montré chez des rongeurs ayant reçu le PACAP que ce dernier prévient la neurodégénérescence et la neuro-inflammation engendrées par des substances toxiques développant un syndrome très similaire à celui de la MP dans des modèles animaux, telles que la 6-OHDA et le MPTP, et qu'il atténue les troubles moteurs causés par ces dernières (Figure 12; Brown et al., 2013, Brown et al., 2014, Deguil et al., 2010, Reglodi et al., 2011, Reglodi et al., 2004b, G. Wang et al., 2008a). Néanmoins,

aucune étude n'avait rapporté à ce jour des effets similaires provenant d'analogues du PACAP dans un modèle animal de la MP.

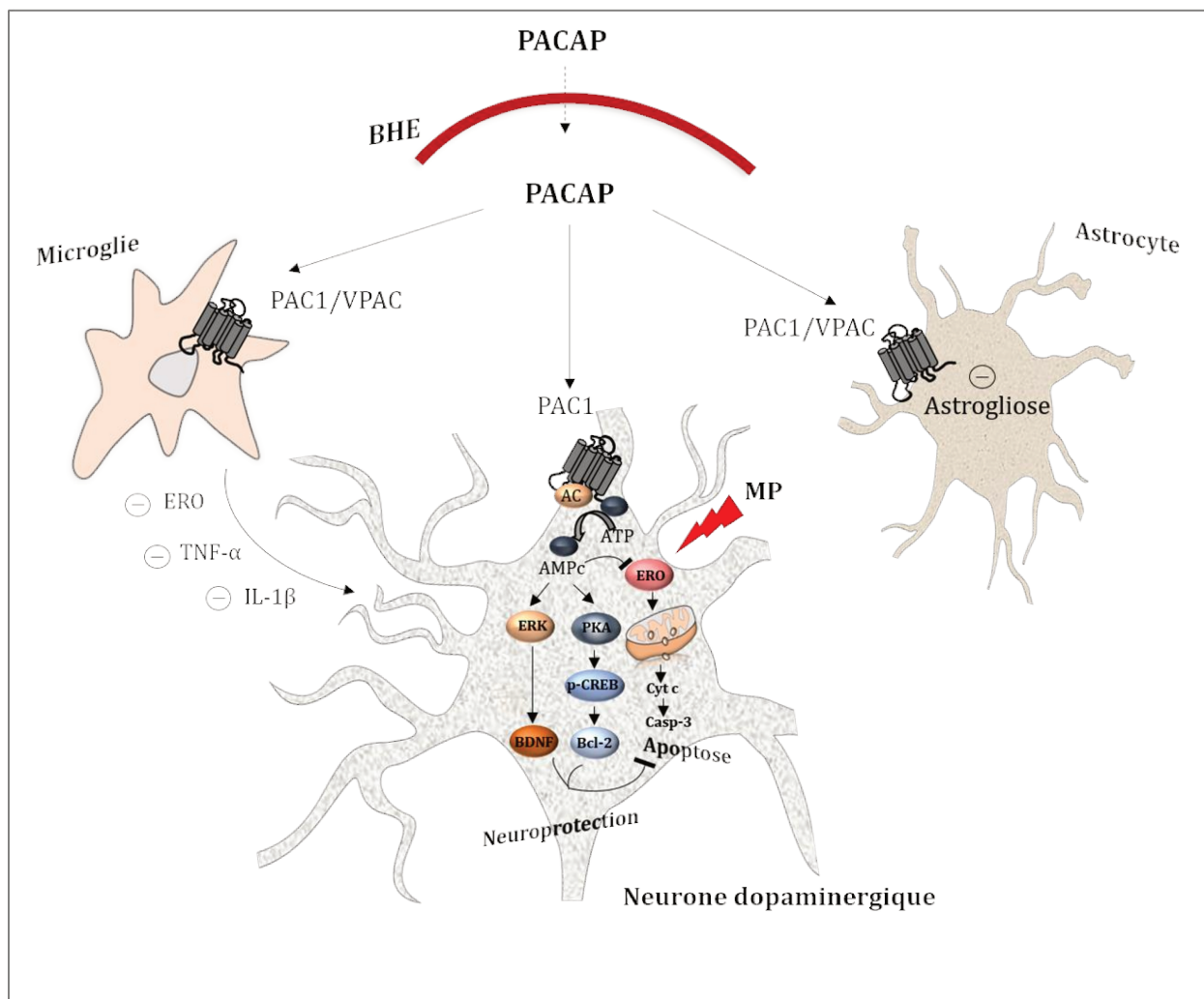


Figure 12. Représentation schématique illustrant les mécanismes généraux impliqués dans l'effet neuroprotecteur du PACAP au cours de la maladie de Parkinson.

Le PACAP franchit la BHE et lit le ou le(s) récepteur(s) PAC1/VPAC présents au niveau de la microglie et des astrocytes pour promouvoir son effet anti-inflammatoire, et ce, en inhibant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-1 β , et l'astrogliose. Au niveau des neurones dopaminergiques, le PACAP lit le récepteur PAC1 et active la production de l'AMPc, qui déclenche l'activation des voies de signalisation impliquées dans l'expression génique de la protéine antiapoptotique Bcl-2. Le PACAP diminue les ERO, inhibe également le relargage du cytochrome c et l'activation de la caspase-3.

Au fil des années, notre groupe de recherche a développé un ensemble d'outils pharmacologiques dérivés du PACAP montrant des améliorations évidentes au niveau pharmacocinétique et biologique. Sur le plan pharmacologique, un grand intérêt est porté aux molécules de petites tailles qui franchissent la BHE et qui génèrent moins d'effets

secondaires sur le système nerveux central et périphérique. Dans notre cas, nous avons prêté attention aux analogues issus de la forme courte du PACAP (PACAP27) en raison de (i) sa taille moins volumineuse que celle du PACAP38, (ii) son transport non saturable à travers le cerveau (Dogrukol-Ak et al., 2004), (iii) sa capacité à générer moins d'effets secondaires que le PACAP38 (Ishizuka et al., 1992) et (iv) sa stabilité métabolique supérieure à celle de l'isoforme de 38 acides aminés. C'est ainsi que nous avons identifié l'analogue Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) dont les caractéristiques suggèrent qu'il est un gabarit moléculaire très prometteur, utile dans la poursuite de nos démarches visant la conception de puissants composés neuroprotecteurs actifs in vivo.

À cet égard, malgré l'affinité réduite de l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) envers PAC1, VPAC1 et VPAC2, comparée à celles des isoformes natives du PACAP, il est apparu que les modifications introduites dans ce dérivé ont affecté beaucoup plus l'affinité de liaison pour les récepteurs VPAC1 et VPAC2 que celle pour PAC1. En effet, lorsque les données des tests de liaison ont été normalisées entre elles en prenant les rapports calculés à partir des résultats obtenus avec PAC1, nous avons observé que la sélectivité de liaison de l'analogue pour PAC1, comparativement aux récepteurs VPAC1 et VPAC2, a été augmenté de 2× ou de 4×, selon que nous utilisons l'affinité du PACAP38 ou celle du PACAP27 comme base de comparaison. En considérant que l'acétylation de l'amine libre du segment N-terminal et la substitution du résidu Met-17 par la norleucine ne modifient pas l'activité biologique du PACAP (Bourgault et al., 2009a), nos données des tests de liaison confirment l'hypothèse d'un rôle clé de l'hydrophobicité du résidu Phe-6 dans la modification de l'affinité de l'analogue envers VPAC1 et VPAC2 (Bourgault et al., 2009b). En outre, la puissance de l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) à produire de l'AMPC n'est pas très différente de celle des isoformes du PACAP. Par ailleurs, afin de prévenir la mort neuronale, un médicament doit obligatoirement être capable de traverser la BHE. Comme décrit précédemment (revue de la littérature), des études ont montré que le PACAP38 traverse la BHE par un système de transport saturable en utilisant la PTS-6 comme véhicule, alors que le PACAP27 franchit passivement la BHE par un processus non saturable de sorte que son accumulation dans le cerveau dépend de sa demi-vie dans la circulation sanguine (Banks et al., 1993, Nonaka et al., 2005). À cet égard, il est incontestable que l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) franchit efficacement la BHE et

stimule significativement la production d'AMPc au niveau des neurones dopaminergiques, comme le démontre sa capacité à freiner la dégénérescence des neurones de la SN lorsqu'il est injecté iv. Outre cela, sa stabilité métabolique fortement accrue ainsi que son hydrophobicité amplifiée favorisent probablement son passage au niveau du cerveau. Ces attributs font en sorte que l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) est aussi puissant que le PACAP38 pour contrer les effets délétères du MPTP administré au préalable à des souris C57BL/6. Ceci est notamment soutenu par son efficacité à restaurer l'immunoréactivité de type TH dans les neurones dopaminergiques de la région nigrale.

Un autre aspect intéressant du MPTP est sa propension à induire l'activation de la microglie et l'expression des cytokines pro-inflammatoires à savoir le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6 (Garcia et al., 2010, Lofrumento et al., 2011). Il a également été montré dans un modèle expérimental de la MP reproduit par le MPTP que le VIP est capable de protéger les neurones dopaminergiques, et ce, en exerçant un effet anti-inflammatoire contre l'activation des cellules microgliales et la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires induites par le MPTP. Cette activité anti-inflammatoire a aussi été observée avec le PACAP (Delgado et al., 2003b). Dans ce contexte, notre étude in vivo a révélé que le PACAP38 et l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) réduisent efficacement l'expression des marqueurs pro-inflammatoires, incluant le TNF- α et l'IL-6, lors d'une exposition au MPTP et diminuent l'augmentation des taux d'ARNm codant pour la caspase-3, l'enzyme clé de l'apoptose. En complément, il importe de souligner la réduction significative par le PACAP et son analogue de synthèse, de l'ARNm codant pour le TNF- α , une cytokine jouant un rôle prépondérant dans le processus neuro-inflammatoire. Ainsi, il a été montré chez des singes parkinsoniens que des niveaux plasmatiques élevés de TNF- α sont encore détectés même une année après les avoir traités avec le MPTP. Barcia et al. ont alors suggéré que le TNF- α promeut la dégénérescence des neurones dopaminergiques au cours de la MP (Barcia et al., 2005). En conséquence, la modulation de la régulation du TNF- α devrait être une caractéristique essentielle à considérer lors de la conception de médicaments efficaces pour traiter la MP. L'ensemble de ces données, indique que tout comme le PACAP38, l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) exerce in vitro et in vivo des effets neuroprotecteurs qui sont médiés par sa capacité à inhiber l'expression de la

caspase-3 responsable de l'apoptose des neurones dopaminergiques et à réduire la neuro-inflammation associée à cette mort cellulaire.

Bien que le récepteur VPAC2 soit une cible potentielle pour le traitement du diabète de type 2 et puisse également être lié à des effets neuroprotecteurs, celui-ci peut générer divers effets indésirables une fois stimulé par certains agonistes ou par le PACAP. Nous notons à ce titre, la rétention d'eau (Tsutsumi et al., 2002), des lésions cérébrales (Darsalia et al., 2013), la vasodilatation (Warren et al., 1992), l'hypotension et l'augmentation de la fréquence cardiaque (Ishizuka et al., 1992, Nandha et al., 1991). À ce propos, il a été montré par Patrone et coll. que le Bay 55-9837, un agoniste du récepteur VPAC2 est responsable d'effets délétères chez le rat Goto-Kakizaki (GK), spontanément porteur d'un diabète de type 2 et ayant subi un AVC par occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (Darsalia et al., 2013). En particulier, l'agoniste conçu pour traiter le diabète de type 2 a induit chez cet animal une augmentation de la mortalité cellulaire et une aggravation de l'AVC, sans pour autant améliorer le diabète (Tsutsumi et al., 2002). Dans ce contexte, il est essentiel de prendre en considération ces observations, afin de concevoir une molécule efficace et appropriée pour le traitement de la MP. De plus, cette molécule doit impérativement être dépourvue d'effets secondaires sur le système cardiovasculaire puisque les patients souffrant de la MP présentent un déséquilibre de la régulation autonome de l'activité cardiaque, une hypotension orthostatique (Sanchez-Ferro et al., 2013) ainsi qu'un intervalle Q-T corrigé (QTc) prolongé (Ishizaki et al., 1996, Oka et al., 1997). En particulier, la prise d'un médicament à effets secondaires sur le système cardiovasculaire peut provoquer une prolongation ou une diminution de l'intervalle QTc et ainsi causer la mort subite chez ces patients (Ishizaki et al., 1996).

Donc, un médicament dérivé du PACAP, destiné au traitement de maladies neurodégénératives, devra nécessairement montrer une puissante activité antiapoptotique tout en affichant des effets périphériques limités, principalement sur le système cardiovasculaire. À cet égard, notre étude in vivo a montré que malgré sa plus grande stabilité métabolique, l'Ac-[Phe(pl)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) produit des variations moindres de la PAM que ne le fait le PACAP38, lorsqu'il est administré iv à la même dose

que celle garantissant une protection efficace des neurones dopaminergiques. De plus, aucune variation de la fréquence cardiaque n'a été observée comparativement aux souris contrôles. Nos données suggèrent que l'affinité relativement faible de l'Ac-[Phe(p)]⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) envers les récepteurs VPAC serait probablement à l'origine de ces observations. Toutefois, comme proposé par Farnham et coll. ceci n'exclut pas une possible implication du récepteur PAC1 dans ces effets (Farnham et al., 2011). En effet, les auteurs ont observé qu'une injection intrathécale de PACAP38 chez des rats normotensifs ou spontanément hypertensifs, induit une augmentation de la fréquence cardiaque et une activité des neurones sympathiques. De plus, ces effets sont inhibés par l'antagoniste PACAP(6-38) suggérant de ce fait que le système PACAPergique est impliqué. Néanmoins, l'utilisation d'autres antagonistes spécifiques est nécessaire pour identifier le ou les récepteur(s) qui interviennent dans ces réponses surtout que ces dernières n'ont été enregistrées qu'après une injection intrathécale et peuvent correspondre à une réaction réflexe de l'organisme. Par ailleurs, l'affinité réduite de l'analogue envers les récepteurs VPAC diminue probablement sa capture périphérique après une administration iv, ce qui améliore vraisemblablement sa probabilité à atteindre le cerveau. De plus, sa stabilité prolongée lui confère sûrement une activité biologique améliorée de sorte qu'il peut maintenir des niveaux d'AMPC efficaces pour induire la neuroprotection recherchée.

En bref, l'Ac-[Phe(p)]⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) se présente comme l'archétype d'une nouvelle génération d'analogues du PACAP, prometteurs pour le développement d'agents thérapeutiques multifonctionnels, utiles pour ralentir, stopper et peut-être même renverser la progression des pathologies dégénératives. De façon évidente, un tel analogue est en mesure d'apporter un gain thérapeutique par rapport aux médicaments actuellement disponibles sur le marché, lesquels, malgré qu'ils soient pourvus d'effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires, présentent des effets indésirables qui limitent leur utilisation clinique, comme ce fut le cas avec le Rolipram (Jie Zhu et al., 2001). Ce dernier, un inhibiteur prototypique de la phosphodiesterase-4 (PDE4), a été utilisé comme antidépresseur et il s'est avéré efficace dans des modèles *in vivo* à motif neurodégénératif, tels que la sclérose en plaques (Paintlia et al., 2009), la MA (Gong et al., 2004) et la maladie de Huntington (DeMarch et al., 2008). Certes, ce médicament

possède de puissantes activités neuroprotectrices et anti-inflammatoires (Wang et al., 2012). Toutefois, le fait qu'il génère plusieurs effets secondaires, notamment au niveau du système cardiovasculaire (Novara et al., 1990), limite son utilisation comme composé thérapeutique efficace pour combattre la MP. De plus, lors d'un essai clinique sur des patients atteints de sclérose en plaques, l'étude a dû être interrompue prématurément du fait que ce médicament était extrêmement mal toléré par les patients et que celui-ci augmentait l'activité inflammatoire cérébrale (Bielekova et al., 2009).

Ainsi, comme mentionné, il est maintenant démontré clairement que l'Ac-[Phe(PI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) est un composé efficace dans la prévention de la mort neuronale et du processus inflammatoire caractérisant la MP, et que les actions de cette molécule peptidique sont accompagnées d'effets limités sur le système cardiovasculaire lorsque comparés à ceux du ligand endogène. Malgré tout, l'effet de l'analogue sur la PAM montre qu'il conserve une certaine affinité envers le récepteur VPAC2 puisqu'il n'y a pas abolition complète d'hypotension suite à son administration. Par conséquent, cette contrainte nécessite l'investissement d'efforts additionnels en vue d'obtenir des substances dépourvues d'activité VPAC2. Ceci exige de poursuivre les études de structures-activité en vue d'identifier des modifications chimiques affinées et/ou supplémentaires à introduire au niveau du PACAP. Déjà, des paramètres clés sont connus et nous pouvons focaliser sur ceux-ci. Par exemple, la position 6 revêt une importance très significative et c'est pourquoi une analyse approfondie de ce pharmacophore a été entreprise dans le laboratoire. Ainsi, au moyen d'une stratégie originale de synthèse, l'équipe a produit une série d'analogues du PACAP27 dont le résidu Phe-6 a été transformé de manière à produire des dérivés dont cette position affiche une augmentation importante du caractère hydrophobe et de l'encombrement stérique. L'étude pharmacologique de ces composés a confirmé que l'hydrophobicité de la position 6 est une caractéristique capitale. Cependant, il est maintenant évident que la pochette de liaison du récepteur exige une taille relativement limitée du substituant en 6 puisqu'une augmentation de l'hydrophobicité obtenue par l'incorporation de composantes aromatiques ramifiées provoque une perte substantielle de l'activité biologique (résultats non encore publiés). Il est donc nécessaire de concevoir des analogues contenant à la position 6 une substitution hydrophobe de volume réduit, par exemple par l'ajout de structures

chimiques porteuses d'halogènes tel le fluor reconnu pour son hydrophobicité et sa taille atomique restreinte. Également, notre groupe a récemment montré à partir d'études de signalisation cellulaire que l'isoforme courte du PACAP (PACAP27) est un gabarit moléculaire à privilégier pour le développement d'analogues à potentiel thérapeutique (Poujol de Molliens et al., soumis). Par conséquent, les orientations futures pour le design de dérivés potentiellement utiles comme agents thérapeutiques sont bien ancrées et nous sommes en position pour procéder à une conception d'analogues aux propriétés pharmacologiques bonifiées.

Évidemment, une stratégie thérapeutique faisant appel à des peptides stables, pourvus d'effets bénéfiques et traversant efficacement la BHE, constitue l'approche à favoriser en vue de développer des médicaments efficaces pour le traitement des pathologies neurodégénératives. L'approche médicamenteuse basée sur un gabarit peptidique est simple et relativement peu coûteuse. De plus, elle apporte maints avantages comparativement à d'autres méthodes thérapeutiques, incluant la thérapie génique et l'utilisation d'inhibiteurs de la dégradation de peptides neuroprotecteurs, qui demeurent lourdes et souvent complexes. Plus particulièrement, l'utilisation de cellules souches produisant et libérant le PACAP, ou encore l'usage de vecteurs surexprimant le gène du PACAP au niveau de la SN de patients parkinsoniens, constituent des approches attrayantes. Néanmoins, malgré les résultats significatifs rapportés par Brifault et al. sur les effets bénéfiques de l'implantation de cellules souches libérant le PACAP dans un modèle d'ischémie cérébrale effectuée chez la souris (Brifault et al., 2015), ces approches demeurent compliquées et nécessitent non seulement des interventions chirurgicales mais aussi un long suivi post-opératoire puisque des effets indésirables peuvent surgir à moyen et à long terme (activité tumorigène, effets secondaires provenant d'une surproduction de PACAP, etc.). Dans ce même contexte, l'utilisation de composés empêchant la dégradation du PACAP, comme les inhibiteurs de la DPP IV, constitue une manœuvre attrayante. Toutefois, celle-ci présente certaines contraintes. Par exemple, la DPP IV est une enzyme qui participe non seulement au métabolisme du PACAP mais aussi à la dégradation de plusieurs autres peptides tels que la substance P, le neuropeptide Y et le gastrin-releasing peptide (GRP). Ces hormones peptidiques sont impliquées dans plusieurs processus physiologiques majeurs de sorte que l'inhibition de

leur dégradation peut s'avérer extrêmement problématique pour l'organisme. À titre d'exemple, un maintien de niveaux élevés du neuropeptide Y peut être dangereux puisque ce dernier est étroitement lié à diverses pathologies telles que l'hypertension essentielle, laquelle est un facteur étiologique de l'infarctus du myocarde (Shanks et al., 2013).

2. Étude de l'action du PACAP38 sur le processus autophagique activé dans des modèles in vitro et in vivo de la MP

La mort apoptotique joue un rôle clé dans l'évolution des atteintes neurologiques. Elle représente le résultat d'un ensemble d'événements délétères et complexes pouvant caractériser les processus neurodégénératifs. À cet effet, de nombreux travaux ont examiné de près l'apoptose et les différentes voies de signalisation qu'elle emprunte au cours de ces pathologies incluant la MP (Radi et al., 2014, Schapira et al., 2014). Plus récemment, l'autophagie a également émergé comme un aspect important dans l'étiologie de ces troubles et il a été rapporté qu'elle serait activée lorsque les neurones sont confrontés à des agressions telles que le stress oxydatif (Anglade et al., 1997, Lynch-Day et al., 2012, Martinez-Vicente, 2015, Wong et al., 2011, J. H. Zhu et al., 2003a). À l'heure actuelle, l'autophagie fait l'objet d'un long débat scientifique en rapport avec la nature de son impact sur la cellule (Anglade et al., 1997, Lynch-Day et al., 2012, Wong et al., 2011, Q. Yang et al., 2010b, Y. Zheng et al., 2014, H. Zhou et al., 2012). Ceci soulève l'interrogation suivante : « Est-ce que son activation ou inhibition est bénéfique ou préjudiciable à la cellule ? ». Comme mentionné auparavant (revue de la littérature), l'interruption du processus autophagique ou son activation excessive peuvent l'une et l'autre en faire un médiateur de mort cellulaire; et c'est en fonction des conditions pathologiques que ce processus emprunte une destinée particulière pouvant protéger ou détruire la cellule (Hensley et al., 2015). En particulier, divers travaux ont rapporté l'apparition du processus autophagique dans des modèles expérimentaux in vitro et in vivo de la MP (Hung et al., 2014, Hung et al., 2016, L. Y. Su et al., 2015, Y. Zhang et al., 2017). De plus, l'utilisation d'ARN interférents bloquant l'expression des gènes codant pour les protéines autophagiques Atg8 (LC3), Atg7 et Atg5 prévient la neurotoxicité induite par le MPP⁺ au niveau des neurones (Niu et al., 2016, Wong et al., 2011, J. H.

Zhu et al., 2007), ce qui renforce l'hypothèse de l'implication de l'effet neurotoxique du MPP⁺ dans l'activation de l'autophagie.

Le PACAP est une hormone pléiotropique, avec notamment des actions antiapoptotiques, anti-inflammatoires, antiexcitotoxiques, antioxydantes, etc. visant à rétablir l'intégrité de la cellule lors de différents types d'atteintes neurologiques. En particulier, il a été montré dans plusieurs modèles cellulaires et animaux de la MP que le PACAP atténue les dommages cellulaires et la mort neuronale causés par le MPP⁺ et le MPTP. Il a également été montré que l'AMPc, le second messenger formé suite à l'activation de l'adénylyl cyclase par le PACAP, et la PKA, une kinase activée aussi en cascade, régulent l'autophagie induite par le MPP⁺ (Cherra et al., 2010). En conséquence, l'investigation de l'implication du PACAP sur divers mécanismes liés à l'autophagie, apparaît nécessaire afin de bien délimiter un possible usage thérapeutique des peptides en vue de prévenir et/ou ralentir l'évolution des maladies neurologiques. C'est avec ces considérations à l'esprit que nous avons focalisé nos travaux sur l'évaluation de l'effet du PACAP sur le processus autophagique induit respectivement in vitro et in vivo par le MPP⁺ et le MPTP, et ce, dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites dans la première partie de cette étude. Bien que l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) ait montré des effets neuroprotecteurs très significatifs vis-à-vis des processus délétères induits par le MPP⁺ et le MPTP, seul l'effet du PACAP est exploré au cours de cette deuxième partie du projet puisque d'autres études de type structure-activité sont nécessaires en vue d'obtenir une nouvelle génération d'analogues dépourvus des effets liés à l'activation du récepteur VPAC2.

Les cellules SH-SY5Y (phénotype neuronal dopaminergique), objet de notre modèle de neurodégénérescence in vitro, ont été exposées à un stress aigu généré par le MPP⁺. De fait, nos travaux in vitro indiquent qu'une exposition de 24 h en présence de 1,5 mM de MPP⁺ stimule la mise en place du flux autophagique dans ces cellules, comme l'indique l'accumulation accrue du complexe LC3-II, produit par la conjugaison de la protéine Atg8 à la phosphatidyléthanolamine. Nos résultats concordent avec ceux des groupes ayant étudié l'effet du MPP⁺ sur le flux autophagique dans plusieurs types cellulaires (Cherra et al., 2010, Nopparat et al., 2014b, Y. Zhang et al., 2017). En

particulier, d'une part, Govitrapong et coll. ont montré qu'une concentration de 800 μM de MPP^+ est capable d'induire une accumulation de LC3-II et la formation d'autophagosomes au niveau des cellules SH-SY5Y (Nopparat et al., 2014b). D'autre part, le groupe de Lin a mis en évidence la présence de vacuoles autophagiques dans ces mêmes cellules avec une concentration de 2 mM de MPP^+ (Tzeng et al., 2010). En outre, 1,5 mM de MPP^+ a également induit une diminution accentuée du niveau protéique de p62, ce qui suggère qu'une telle concentration de cet agent neurotoxique est capable d'activer la totalité du flux autophagique. L'ensemble de ces actions est certainement associé à l'élimination des mitochondries altérées par la molécule neurotoxique. Ces observations sont consolidées par certaines données antérieures indiquant que l'autophagie est activée dans des conditions de stress oxydatif de modérées à aigües, afin d'éliminer le matériel cellulaire altéré (Kiffin et al., 2006, J. Lee et al., 2012).

Il a ainsi été montré par notre étude et par d'autres travaux que le PACAP est capable de réduire efficacement la neurotoxicité induite par divers agents toxiques dans des cellules SH-SY5Y reproduisant des modèles expérimentaux de la MP (Brown et al., 2013, Brown et al., 2014, Deguil et al., 2007, Doan et al., 2011, Lamine et al., 2016). En effet, le PACAP réduit la mort neuronale des cellules SH-SY5Y, restaure l'activité mitochondriale et, comme montré au cours de ces travaux, préserve l'intégrité des cellules. Toutefois, aucune étude à ce jour n'avait investigué l'impact du peptide sur l'autophagie activée au cours de la MP. Nous avons décrit pour la première fois qu'in vitro, un prétraitement de 4 h avec le PACAP diminue l'accumulation de LC3-II générée par le MPP^+ dans des cellules SH-SY5Y. De plus, nous avons rapporté que le peptide conduit aussi à la restauration des niveaux protéiques de p62 réduit préalablement par le MPP^+ . En accord avec ces observations, nous pouvons postuler que le PACAP peut contrer les effets proautophagiques du MPP^+ . À ce niveau, nous nous sommes posés la question si cette activité antiautophagique provenait de l'action antiapoptotique que peut induire le PACAP sur les cellules SH-SY5Y ou s'il s'agissait d'une modulation directe du flux autophagique par le peptide. Afin d'apporter un début de réponse, nous avons exposé les cellules au PACAP et à la rapamycine, une molécule de nature antibiotique qui active l'autophagie en inhibant la mTOR. Suite à ce traitement, le peptide a restauré significativement le niveau protéique de p62, confirmant ainsi l'effet inhibiteur exercé par

le PACAP sur l'autophagie. De plus, cette action a également été confirmée par la diminution des vacuoles autophagiques induites par du MPP⁺ dans des cellules SH-SY5Y transfectées préalablement avec la LC3 marquée avec la protéine fluorescente verte (GFP). Ces résultats viennent alors renforcer notre hypothèse selon laquelle le PACAP régule l'autophagie induite in vitro par le MPP⁺. Dans leur ensemble, nos données issues du modèle MPP⁺ de neurotoxicité montrent que le PACAP est en mesure de contrer la mort neuronale, de restaurer l'activité mitochondriale, de limiter la formation de LC3-II, de prévenir la diminution du niveau protéique de p62 et de réduire la formation des vacuoles autophagiques. Sur la base de ces résultats, il apparaît clairement que le PACAP peut moduler le processus autophagique mis en place sous l'action du MPP⁺. Toutefois, les mécanismes moléculaires activés pour produire son effet antiautophagique demeurent encore largement méconnus.

À ce propos, il a été rapporté que le PACAP est un puissant stimulant de la production d'AMPc (Vaudry et al., 2000b) et que les niveaux intracellulaires de celle-ci régulent négativement l'autophagie (Ravikumar et al., 2010). Aussi, des études évaluant l'effet antiapoptotique du PACAP ont démontré qu'une cascade d'événements moléculaires est mise en place à la suite de l'activation du récepteur PAC1, ce qui augmente les niveaux de Bcl-2 et bloque l'expression de Bax (Seaborn et al., 2011a). Donc, après un traitement au PACAP, l'environnement intracellulaire favorise les interactions des protéines Bcl-2 et Beclin connues comme éléments clés de l'inhibition de l'autophagie et de la translocation de Bax aux membranes mitochondriales et aux lysosomes. Govitrapong et coll. ont montré que le MPP⁺ peut déclencher et activer le processus autophagique, en particulier en diminuant les interactions Bcl-2/Beclin dans un modèle cellulaire de la MP (Nopparat et al., 2014b). Nous pouvons suggérer que l'effet antiautophagique qu'exerce le PACAP sur l'autophagie induite par le MPP⁺ peut être lié aux hauts niveaux de Bcl-2 induits par ce même peptide.

Diverses études ont confirmé que le MPTP reproduit de façon relativement fidèle des caractéristiques neurodégénératives associées à la MP. Notamment, dans nos laboratoires, nous avons observé que cette molécule neurotoxique cause la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la région nigrale des souris

C57BL/6. L'administration du PACAP à ces mêmes souris traitées préalablement avec le MPTP permet d'atténuer la mort neuronale et de restaurer les niveaux d'expression de la TH. En outre, nos résultats ont révélé qu'un traitement subchronique avec le MPTP induit l'expression du complexe LC3-II et augmente la formation d'autophagosomes au niveau de la SN. Ces résultats sont en accord avec les données de Dehay et Bézard qui ont montré que le MPTP peut augmenter les niveaux protéiques de LC3-II dans le même modèle animal que celui utilisé pour notre étude (Dehay et al., 2010). Étonnamment toutefois, contrairement à ce qui avait été observé *in vitro*, le MPTP administré seul n'a pas diminué les taux de p62, suggérant de ce fait que le flux autophagique avait été probablement interrompu (Bjorkoy et al., 2009, Lim et al., 2014). Cette observation peut être expliquée par la différence de paradigmes (cellules de neuroblastomes humains comme modèle *in vitro* et souris traitées avec du MPTP comme modèle *in vivo*), à savoir que les rongeurs et les primates présentent des sensibilités différentes vis-à-vis de la neurotoxicité du MPTP (Johannessen et al., 1985). Nos résultats peuvent également être expliqués par la durée du stress induit. En étant aigu ou chronique, les deux formes de stress peuvent avoir un impact différent sur les cellules. Ainsi, en réponse à des conditions différentes, la cellule peut adopter diverses façons de réagir aux différents agresseurs. Par exemple, avec un traitement aigu comme celui utilisé lors de notre étude *in vitro* avec le MPP⁺, la cellule peut activer l'autophagie pour éliminer les organites endommagés tels que les mitochondries (mitophagie). En revanche, exposés à un stress prolongé (chronique ou subchronique comme celui provoqué par le MPTP dans notre étude *in vivo*), les neurones se trouvent envahis d'ERO et d'organites altérés. Dans de telles conditions, les neurones sont incapables d'activer la totalité du processus autophagique, ce qui entraîne en partie la destruction des cellules. En accord avec cette explication, il a été démontré qu'un stress prolongé peut engendrer une perturbation du flux autophagique (Dehay et al., 2010, S. Zheng et al., 2017). De même, dans un modèle expérimental de la MP, une altération de la fonction lysosomale a été observée chez des souris traitées avec le MPTP, en parallèle avec l'interruption du flux autophagique (Dehay et al., 2010). Ces constatations vont dans le même sens que les données de Agid et coll. obtenues à partir d'échantillons de cerveaux issus de patients parkinsoniens (Anglade et al., 1997).

Par ailleurs, il a été fréquemment rapporté que le dysfonctionnement mitochondrial joue un rôle causal dans la pathogénie de la MP (Bulteau et al., 2017, Parker et al., 1998, Winklhofer et al., 2010). Comme décrit dans la revue de la littérature, les mutations touchant le couple de gènes PINK-1/Parkin sont souvent associées aux deux formes de la MP. Les protéines codées par ces gènes jouent un rôle primordial dans le recyclage des mitochondries à l'intérieur de la cellule. En effet, lorsque les mitochondries sont altérées, la protéine PINK-1 s'accumule à la surface de ces dernières et recrute Parkin afin de déclencher la mitophagie conduisant à l'élimination des mitochondries dysfonctionnelles (Pickrell et al., 2015). Néanmoins, quand une mutation touche les gènes codant pour ces protéines, cela entraîne la perturbation de la mitophagie et l'accumulation des mitochondries altérées (Deas et al., 2011). Il semble ainsi que cette situation soit précisément rencontrée au niveau des neurones dopaminergiques de patients atteints de la MP (Ryan et al., 2015). En lien avec cette observation, une étude récente a démontré que le PACAP induit une action bénéfique sur les mitochondries, et ce, en régulant les niveaux d'expression de la protéine peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (Pgc1 α), un régulateur transcriptionnel de la biogenèse mitochondriale (Kambe et al., 2012). En accord avec ces résultats, nous avons observé que le PACAP peut contrer l'augmentation du niveau protéique de LC3-II, de réduire la formation des vacuoles autophagiques induites dans la région nigrale par le MPTP et de préserver le niveau protéique basal de p62. En conséquence, nos résultats *in vivo* vont dans le même sens que nos données *in vitro*. De plus, nous pouvons associer l'effet antiautophagique du PACAP induit *in vivo* avec sa régulation positive de la protéine antiapoptotique Bcl-2. Ainsi, un traitement avec le PACAP peut offrir aux cellules non seulement une protection contre l'activation des processus apoptotiques et autophagiques induits par le MPP⁺ et le MPTP, mais aussi un renouvellement des mitochondries.

Globalement, nous pouvons suggérer que le PACAP permet à la cellule, par le biais de l'activation de plusieurs voies moléculaires, de s'adapter aux différentes conditions de stress (aigües ou prolongées) imposées par les substances neurotoxiques. *In vitro*, un prétraitement avec le PACAP permet aux cellules SH-SY5Y : (i) de s'opposer aux effets neurotoxiques du MPP⁺ en réduisant la mort neuronale, en rétablissant l'activité

mitochondriale et en restaurant l'intégrité cellulaire; et (ii) d'exercer un rétrocontrôle négatif sur l'autophagie (dont son activation n'est plus nécessaire dans ce genre de situation) comme traduit par une diminution du niveau d'expression de LC3-II, la réduction des autophagosomes, et le rétablissement des taux protéiques de p62. In vivo, l'administration du PACAP à des souris C57Bl/6 a permis de freiner les effets délétères de MPTP, notamment en rétablissant les niveaux d'expression de la TH et en inhibant le flux autophagique.

En somme, l'activité antiautophagique révélée au cours de cette étude, ainsi que l'ensemble des effets neuroprotecteurs du PACAP, tels que ses actions antioxydantes, anti-inflammatoires, antiexcitotoxiques et antiapoptotiques, rapportés par de nombreux travaux dont les nôtres, ne font qu'élargir la fenêtre des usages thérapeutiques possibles du PACAP. En effet, il appert qu'un dérivé sélectif et puissant du PACAP pourra non seulement traiter la MP mais aussi beaucoup d'autres maladies neurodégénératives telles que la MA (Satomi Onoue et al., 2002b), la sclérose latérale amyotrophique (Bonaventura et al., 2018), la maladie de Huntington (Tamas et al., 2006b), etc. Dans ce contexte, ces pathologies neurodégénératives partagent en commun divers processus physiopathologiques comme le stress oxydatif et l'excitotoxicité (Beal, 1995). Également, plusieurs études ont rapporté le rôle crucial que joue le processus neuro-inflammatoire dans la pathogenèse de ces maladies (W W Chen et al., 2016) et l'altération de l'autophagie apparaît maintenant comme une composante clé dans l'exacerbation de la neurodégénérescence au cours de ces atteintes (Nah et al., 2015a). À partir de cette toile de fond, établie au moyen de divers modèles cellulaires et animaux reproduisant un aspect proche des syndromes neurodégénératifs associés aux atteintes cérébrales, il est dorénavant largement documenté que le PACAP antagonise efficacement ces mécanismes délétères. En conséquence, par son action multicible jumelée à une capacité à franchir la BHE, le PACAP apparaît comme un gabarit moléculaire unique pour le développement de composés d'usage clinique ciblant la dimension multifactorielle des maladies neurodégénératives.

Conclusion et Perspectives

Chapitre 5 : Conclusion et Perspectives

Au terme de ce projet, notre étude a mis en évidence, dans une première partie, le potentiel neuroprotecteur de l'analogue Ac-[Phe(pl)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) dans des modèles expérimentaux de la MP, avec des effets secondaires sur le système cardiovasculaire significativement atténués. En effet, bien que les résultats montrent que les modifications chimiques introduites au niveau de l'analogue ont affecté son affinité vis-à-vis des récepteurs du PACAP, l'activité neuroprotectrice du peptide a été intégralement préservée, comme révélé lorsque comparée à celle de la molécule native. En particulier, *in vitro*, comme illustré à la Figure 13, la molécule-mère et son dérivé synthétique ont réduit significativement la neurotoxicité au niveau des cellules SH-SY5Y ainsi que l'altération du potentiel membranaire mitochondrial engendrées par le MPP⁺. Compte tenu de son efficacité à produire de l'AMPC, l'effet neuroprotecteur de l'Ac-[Phe(pl)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) provient vraisemblablement de l'activation du récepteur PAC1. En outre, malgré une affinité réduite envers les récepteurs du PACAP, l'analogue a freiné efficacement *in vivo* la dégénérescence des neurones dopaminergiques causée par le MPTP. Il a également régulé à la baisse les niveaux d'expression de la caspase-3 et des cytokines pro-inflammatoires (Figure 13). Cette activité neuroprotectrice vigoureuse est probablement liée non seulement à l'amélioration de la stabilité métabolique de l'analogue mais aussi à sa capacité à franchir la BHE puisque le peptide natif (PACAP27) se rend au cerveau grâce à un mécanisme de diffusion passive, non saturable. Comme mentionné préalablement, nos résultats ont démontré que l'Ac-[Phe(pl)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27), en comparaison au PACAP, exerce moins d'actions sur la PAM, suggérant par conséquent que les modifications chimiques introduites dans le peptide contribuent à réduire les effets indésirables liés à l'activation du récepteur VPAC2. À l'heure actuelle, il n'existe malheureusement pas de traitement contre la MP capable de guérir la maladie ou du moins d'enrayer définitivement son évolution rattachée à son caractère multifactoriel complexe. En fait, les thérapies existantes ne sont que symptomatiques puisqu'elles ne font qu'améliorer la condition sans nécessairement ralentir la progression. Le besoin d'une nouvelle approche thérapeutique efficace et multicible est donc très présent et celle-ci doit viser la prévention et/ou l'arrêt de la perte des neurones dopaminergiques et des symptômes qui en découlent, tout en maintenant

les effets secondaires à un niveau négligeable. Dans ce contexte, en fonction de nos résultats et de plusieurs autres travaux relevant les puissants effets neuroprotecteurs du PACAP face à plusieurs atteintes cérébrales, nous pouvons suggérer que ce peptide, et plus précisément des analogues du PACAP, représentent un nouvel horizon thérapeutique pour traiter le caractère multifactoriel de la MP, en ralentissant voire en stoppant sa progression. Ultiment, cette approche pourrait même conduire à une certaine régénérescence neuronale et à une récupération des fonctions des neurones dopaminergiques de la SN. Donc, l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) représente un gabarit moléculaire très prometteur pour le développement de médicaments capables de protéger efficacement les neurones et mettre fin au processus neurodégénératif. Par conséquent, dans la continuité de cette partie du projet, notre équipe poursuit ses travaux de type structure-activité afin de concevoir d'autres analogues qui répondront encore plus adéquatement aux besoins cliniques.

Dans ce contexte, des améliorations d'ordre pharmacologique seront requises au niveau du segment N-terminal de l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) en vue de générer des analogues aux propriétés recherchées et affichant des effets mineurs voire nuls sur le système cardiovasculaire. De plus, en préservant l'activité biologique et la sélectivité du peptide vis-à-vis du récepteur PAC1, nous pourrions vraisemblablement tirer profit de son action insulinothèque (Jamen et al., 2002). En effet, des travaux antérieurs ont rapporté que les patients atteints de la MP souffrent fréquemment de diabète de type 2, en association notamment avec des problèmes manifestés au niveau du système cardiovasculaire. Par conséquent, un médicament conçu à partir d'un analogue du PACAP, tel l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27), auquel quelques modifications chimiques et structurelles additionnelles seraient ajoutées, se présenterait comme une stratégie thérapeutique efficace pour le traitement de la MP et de certaines autres pathologies associées à la maladie. En outre, contrairement aux médicaments nécessitant une administration par voie intraveineuse, une médication basée sur le PACAP serait avantageuse par sa possibilité d'administration par voie intranasale, laquelle permet d'acheminer efficacement le peptide dans le cerveau. En effet, Kojro et coll. ont montré dans un modèle animal reproduisant certaines caractéristiques de la MA que le PACAP

exerce de puissants effets neuroprotecteurs après une administration par voie intranasale (Rat et al., 2011).

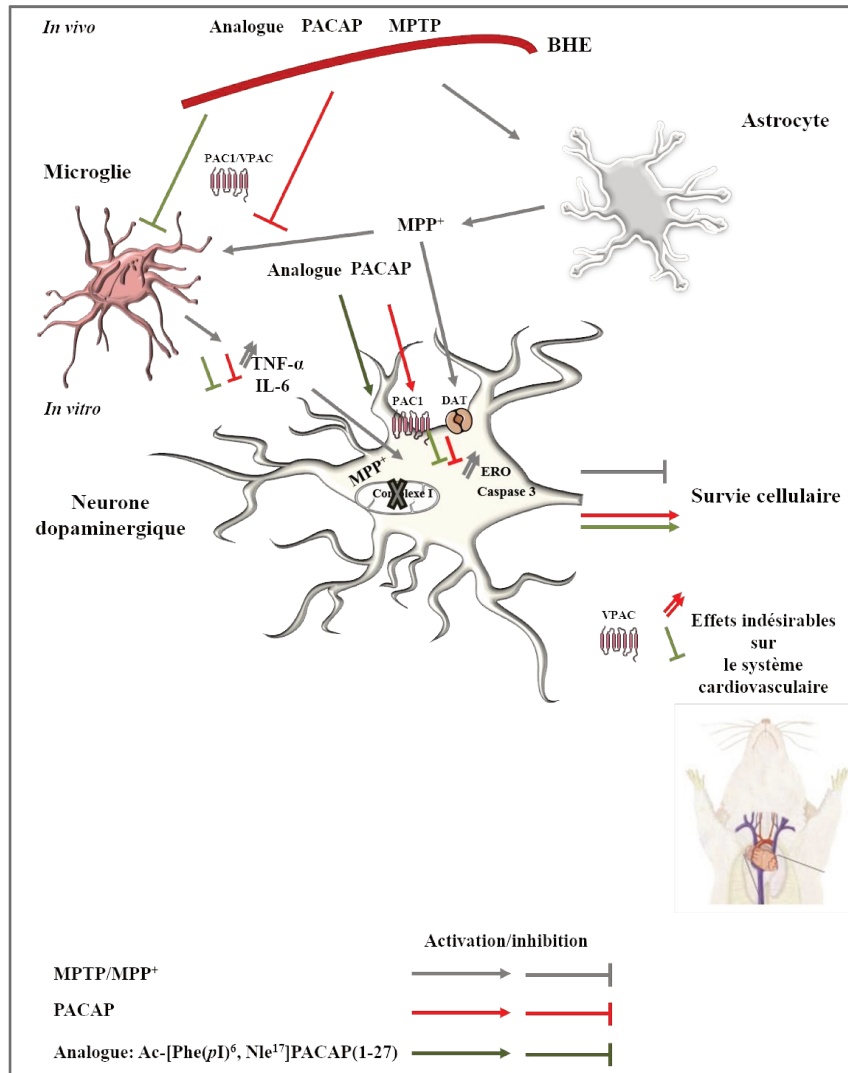


Figure 13. Représentation schématique illustrant les différents effets induits par le PACAP et son dérivé synthétique l'Ac-[Phe(pI)⁶, Nle¹⁷]PACAP(1-27) dans des modèles de la MP.

Au terme de la deuxième partie de ce projet, nous avons montré pour la première fois, qu'outre ses propriétés neuroprotectrices, le PACAP peut moduler négativement le processus autophagique activé par le MPP⁺ et son précurseur le MPTP (Figure 14). Nos résultats révèlent un mécanisme cellulaire supplémentaire sur lequel peut agir le PACAP,

ce qui offre un avantage sur l'action multicible du peptide et sur le traitement des maladies neurodégénératives caractérisées par un dérèglement du processus autophagique. Nos données suggèrent également que les effets neuroprotecteurs du PACAP sont probablement étroitement liés à son action antiautophagique puisque le peptide inhibe à la fois la caspase-3 et les marqueurs autophagiques, dont le complexe LC3-II. Nos données permettent d'émettre l'hypothèse que le potentiel neuroprotecteur du PACAP provient de diverses voies complémentaires mettant en jeu quelques acteurs moléculaires qui interviennent à la fois au niveau des processus apoptotiques et autophagiques, tels que les membres de la sous-famille antiapoptotique Bcl-2 incluant Bcl-2, Bcl-xL ainsi que Akt. Malgré l'éclairage nouveau fourni par ces études, d'autres travaux s'avèrent indispensables afin d'évaluer plus en profondeur la relation existant entre les effets neuroprotecteurs et antiautophagiques observés avec le PACAP dans des modèles expérimentaux de la MP.

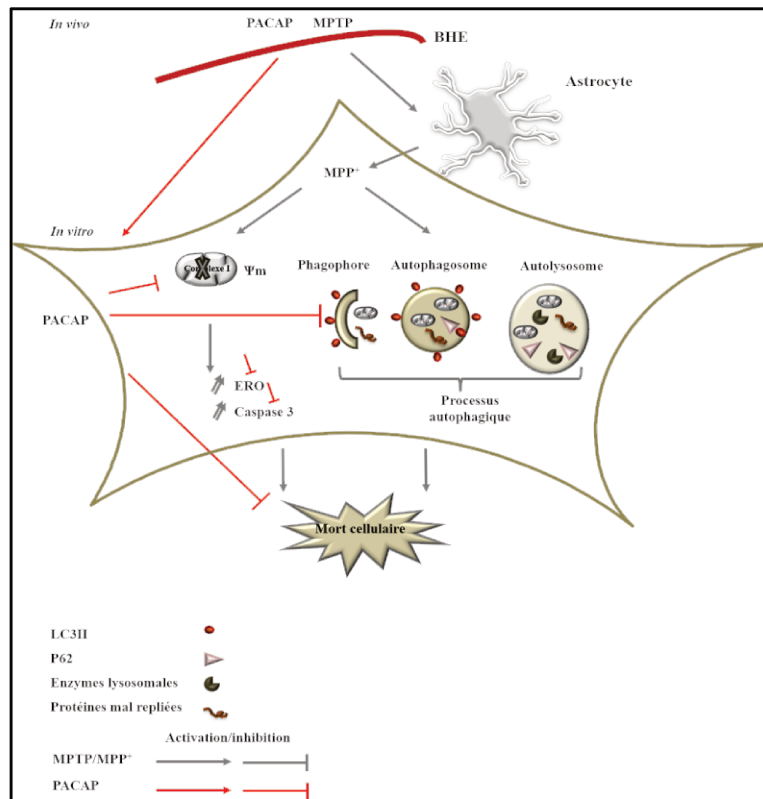


Figure 14. Représentation schématique illustrant les différents effets exercés par le PACAP vis-à-vis du processus autophagique induit par le MPP⁺/MPTP in vitro et in vivo.

D'une part, dans la continuité de nos activités de recherche, nous proposons une investigation des voies moléculaires qu'emprunte le PACAP dans l'induction de ses effets antiautophagiques, toujours dans un modèle connu et éprouvé de la MP. D'autre part, nous croyons utile de disséquer la relation existant entre la neuroprotection et l'inhibition de l'autophagie médiées par le PACAP dans ce même modèle. En vue d'inhiber l'effet antiautophagique du PACAP, nous prévoyons l'usage d'antagonistes des récepteurs du peptide, tels le PACAP(6-38) et le [Sar⁴]PACAP38 (Bourgault et al., 2009b) dans les mêmes conditions de culture et de traitement décrites précédemment, soit un prétraitement pendant 4 h avec 10⁻⁷ M de PACAP puis un traitement avec 1,5 mM de MPP⁺. Nous postulons que l'activité est essentiellement médiée par le récepteur PAC1 et qu'elle sera inhibée par l'un ou l'autre des antagonistes. À cet effet, nous utiliserons différents inhibiteurs des voies moléculaires connues comme cibles du PACAP afin de bloquer celle(s) impliquée(s) dans la modulation négative de l'autophagie. Pour ce faire, nous inhiberons la voie des MAPKinases par l'usage de son inhibiteur spécifique le U0126. Nous bloquerons également la PKC par la chélérythrine, la PLC par le U73122, la PKA par le H89 et finalement, nous inhiberons la voie PI3K/Akt avec le LY294002. Lorsque les antagonistes des récepteurs du PACAP (PACAP(6-38) et le [Sar⁴]PACAP38) ou les inhibiteurs des voies de signalisation ciblées par ce même peptide (U0126, chélérythrine, U73122, H89 et LY294002) seront testés, ils seront additionnés au milieu de culture 30 min avant l'ajout du PACAP. La viabilité cellulaire sera mesurée dans le cadre de chacune des conditions expérimentales en utilisant le test de survie basé sur la réactivité du dérivé MTS (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -5- (3-carboxyméthoxyphényl) -2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium). Nous utiliserons également la technique d'immunobuvardage de type Western afin d'évaluer les marqueurs autophagiques, incluant le complexe LC3-II et la protéine p62, ainsi que la caspase-3. Par la suite, les autophagosomes et autolysosomes seront marqués par la monodansylcadavérine pour permettre leur visualisation par microscopie à fluorescence.

Nopparat et al. ont révélé un nouveau mécanisme par lequel le MPP⁺ promeut son effet neurotoxique en faisant appel à l'inhibition de la voie mTOR/PI3K/Akt et à l'activation

de l'expression de Beclin 1 (Nopparat et al., 2014a). Cette même étude a décrit l'implication de Bcl-2 dans l'inhibition de l'autophagie (C. Nopparat et al., 2014b). À ce titre, on a documenté abondamment que l'expression de cette protéine antiapoptotique est induite par le PACAP, ce qui promeut son effet neuroprotecteur (Mansouri et al., 2017). De façon particulière, via l'activation de la voie PI3K/Akt, le PACAP est capable de protéger les neurones en grain contre la neurotoxicité de l'éthanol (Seaborn et al., 2011b). D'un autre côté, il a également été établi que la voie de signalisation JNK décrite auparavant comme étant inhibée par le PACAP (Dohi et al., 2002) est impliquée dans l'induction de l'autophagie (Y. Y. Zhou et al., 2015) et de l'apoptose (Dhanasekaran et al., 2008), et que cette dernière est aussi activée par le MPP⁺ pour stimuler en partie l'effet neurotoxique (Rodriguez-Blanco et al., 2012). Donc, afin de déterminer le ou les acteurs moléculaires modulés par le PACAP et qui interviennent à la fois dans l'inhibition de l'apoptose et de l'autophagie induites par le MPP⁺, nous envisageons l'utilisation d'ARN interférents afin de bloquer l'expression des protéines connues pour être activées par le PACAP comme la Bcl-2, Bcl-xL et Akt et la surexpression de p-JNK, et ce, dans les mêmes conditions expérimentales qu'auparavant. Avec l'utilisation de plaques de 6 ou 12 puits pour la réalisation de cette expérience (transfection avec les ARN interférents), la viabilité cellulaire sera mesurée par la cytométrie de flux. Afin d'évaluer les acteurs moléculaires ciblés par le PACAP ainsi que les marqueurs autophagiques, nous utiliserons également l'immunobuvardage de type Western. De même, les autophagosomes et les autolysosomes seront marqués et visualisés comme décrit précédemment.

Par ailleurs, nous envisagerons l'exploration de l'effet endogène du PACAP sur l'autophagie basale (induite spontanément à l'intérieur de la cellule pour recycler ses organites) et le processus autophagique induit dans des modèles *in vivo* de la MP. Pour ce faire, nous utiliserons des cohortes de souris C57BL/6 sauvages ou invalidées pour le gène du PACAP. Les deux groupes de souris serviront au départ à explorer l'autophagie basale en étudiant par immunobuvardage de type Western les marqueurs autophagiques (LC3-II et p62). Par la suite, afin d'étudier l'action endogène du PACAP sur le processus autophagique modulé au cours de la MP, les 2 groupes de souris seront traités séparément soit avec une solution saline ou avec du MPTP. Le protocole d'injection sera

celui utilisé dans la première étude. De même, les marqueurs autophagiques (LC3-II et p62) seront étudiés par immunobuvardage de type Western et les autophagosomes ainsi que les autolysosomes seront marqués et visualisés comme décrit précédemment.

En définitive, les travaux proposés au terme de cette étude pourront sans aucun doute contribuer à l'avancement de nos connaissances sur les mécanismes moléculaires qu'emprunte le PACAP pour exercer ses actions antiautophagiques et antiapoptotiques au cours de la MP. Toutefois, plusieurs efforts restent à fournir en vue de transformer un analogue du PACAP en médicament d'usage courant. Pour ce faire, il faut tout d'abord garantir l'efficacité, l'innocuité et la qualité de ce médicament. À cet effet, nous assumons que l'analogue du PACAP est efficace à contrer les mécanismes délétères associés à la MP. Au terme de cette étape, il importera de vérifier deux critères importants soit l'efficacité et l'innocuité du peptide, et ce, par le biais d'études précliniques qui évalueront les propriétés pharmacologiques et toxicologiques de la molécule en question. Cette phase est extrêmement importante considérant la multiplicité et la complexité des paramètres à analyser tels que l'ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion), la toxicité génétique, la fenêtre thérapeutique sécuritaire, la toxicologie, etc. Finalement, si la molécule testée est conforme aux critères d'efficacité recherchés et qu'elle est non toxique aux doses requises pour obtenir l'effet escompté, les essais cliniques pourront alors être entamés. Cette troisième étape comprend trois phases dont la première vise à étudier la tolérance à ce médicament chez des volontaires sains (Phase I) et la deuxième phase (Phase II) consiste à étudier la toxicité et l'efficacité chez des patients atteints de la MP. Quant à la troisième phase, son objectif est d'étudier l'efficacité du médicament par rapport à un placebo ou à un médicament de référence chez un nombre élevé de patients parkinsoniens. Au terme de ces essais cliniques, le médicament développé à partir du PACAP pourra alors être mis sur le marché.

Références Bibliographiques

- Aarsland D, Bronnick K, Larsen JP, Tysnes OB & Alves G (2009) Cognitive impairment in incident, untreated Parkinson disease: the Norwegian ParkWest study. *Neurology* 72(13):1121-1126.
- Aarsland D, Emre M, Lees A, Poewe W & Ballard C (2007) Practice parameter: evaluation and treatment of depression, psychosis, and dementia in Parkinson disease (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 68(1):80; author reply 81.
- Abdul-Muneer PM, Long M, Conte AA, Santhakumar V & Pfister BJ (2016) High Ca²⁺ Influx During Traumatic Brain Injury Leads to Caspase-1-Dependent Neuroinflammation and Cell Death. *Mol. Neurobiol.* 10.1007/s12035-016-9949-4.
- Abou-Sleiman PM, Healy DG, Quinn N, Lees AJ & Wood NW (2003) The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 54(3):283-286.
- Allen MT & Levy LS (2013) Parkinson's disease and pesticide exposure--a new assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 43(6):515-534.
- Ambrosi G, Cerri S & Blandini F (2014) A further update on the role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 121(8):849-859.
- Anantharam V, Kaul S, Song C, Kanthasamy A & Kanthasamy AG (2007) Pharmacological inhibition of neuronal NADPH oxidase protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced oxidative stress and apoptosis in mesencephalic dopaminergic neuronal cells. *Neurotoxicology* 28(5):988-997.
- Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marquez J, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Hirsch EC & Agid Y (1997) Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol. Histopathol.* 12(1):25-31.
- Antonini A & Cilia R (2009) Behavioural adverse effects of dopaminergic treatments in Parkinson's disease: incidence, neurobiological basis, management and prevention. *Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience* 32(6):475-488.
- Arduino DM, Esteves AR, Cortes L, Silva DF, Patel B, Grazina M, Swerdlow RH, Oliveira CR & Cardoso SM (2012) Mitochondrial metabolism in Parkinson's disease impairs quality control autophagy by hampering microtubule-dependent traffic. *Hum. Mol. Genet.* 21(21):4680-4702.
- Arima K, Hirai S, Sunohara N, Aoto K, Izumiyama Y, Ueda K, Ikeda K & Kawai M (1999) Cellular co-localization of phosphorylated tau- and NACP/alpha-synuclein-epitopes in lewy bodies in sporadic Parkinson's disease and in dementia with Lewy bodies. *Brain Res.* 843(1-2):53-61.
- Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH & Kitada C (1991) Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 129(5):2787-2789.
- Artal-Sanz M & Tavernarakis N (2005) Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS Lett.* 579(15):3287-3296.
- Ascherio A, Chen H, Weisskopf MG, O'Reilly E, McCullough ML, Calle EE, Schwarzschild MA & Thun MJ (2006) Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 60(2):197-203.

- Athauda D & Foltynie T (2015) The ongoing pursuit of neuroprotective therapies in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* 11(1):25-40.
- Atlasz T, Koszegi Z, Babai N, Tamas A, Reglodi D, Kovacs P, Hernadi I & Gabriel R (2006) Microiontophoretically applied PACAP blocks excitatory effects of kainic acid in vivo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1070:143-148.
- Aubert N, Falluel-Morel A, Vaudry D, Xifro X, Rodriguez-Alvarez J, Fisch C, de Jouffrey S, Lebigot JF, Fournier A, Vaudry H & Gonzalez BJ (2006) PACAP and C2-ceramide generate different AP-1 complexes through a MAP-kinase-dependent pathway: involvement of c-Fos in PACAP-induced Bcl-2 expression. *J. Neurochem.* 99(4):1237-1250.
- Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G & Ktistakis NT (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 182(4):685-701.
- Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee VM, Trojanowski JQ & Iwatsubo T (1998) Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol.* 152(4):879-884.
- Babai N, Atlasz T, Tamas A, Reglodi D, Toth G, Kiss P & Gabriel R (2005) Degree of damage compensation by various PACAP treatments in monosodium glutamate-induced retinal degeneration. *Neurotox. Res.* 8(3-4):227-233.
- Banerjee R, Beal MF & Thomas B (2010) Autophagy in neurodegenerative disorders: pathogenic roles and therapeutic implications. *Trends Neurosci.* 33(12):541-549.
- Banks WA, Kastin AJ & Arimura A (1998) Effect of spinal cord injury on the permeability of the blood-brain and blood-spinal cord barriers to the neurotrophin PACAP. *Exp. Neurol.* 151(1):116-123.
- Banks WA, Kastin AJ, Komaki G & Arimura A (1993) Passage of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide1-27 and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide1-38 across the blood-brain barrier. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 267(2):690-696.
- Banks WA, Uchida D, Arimura A, Somogyvari-Vigh A & Shioda S (1996) Transport of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide across the blood-brain barrier and the prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 805:270-277; discussion 277-279.
- Bano D, Young KW, Guerin CJ, Lefevre R, Rothwell NJ, Naldini L, Rizzuto R, Carafoli E & Nicotera P (2005) Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity. *Cell* 120(2):275-285.
- Barcia C, de Pablos V, Bautista-Hernandez V, Sanchez-Bahillo A, Bernal I, Fernandez-Villalba E, Martin J, Banon R, Fernandez-Barreiro A & Herrero MT (2005) Increased plasma levels of TNF-alpha but not of IL1-beta in MPTP-treated monkeys one year after the MPTP administration. *Parkinsonism & related disorders* 11(7):435-439.
- Barnum CJ, Chen X, Chung J, Chang J, Williams M, Grigoryan N, Tesi RJ & Tansey MG (2014) Peripheral administration of the selective inhibitor of soluble tumor necrosis factor (TNF) XPro(R)1595 attenuates nigral cell loss and glial activation in 6-OHDA hemiparkinsonian rats. *J. Parkinsons Dis.* 4(3):349-360.
- Bartels AL, Willemsen AT, Doorduyn J, de Vries EF, Dierckx RA & Leenders KL (2010) [11C]-PK11195 PET: quantification of neuroinflammation and a monitor of anti-inflammatory treatment in Parkinson's disease? *Parkinsonism Relat. Disord.* 16(1):57-59.

- Bas J, Calopa M, Mestre M, Mollevi DG, Cutillas B, Ambrosio S & Buendia E (2001) Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of parkinsonism. *Journal of neuroimmunology* 113(1):146-152.
- Basille M, Falluel-Morel A, Vaudry D, Aubert N, Fournier A, Freger P, Gallo-Payet N, Vaudry H & Gonzalez B (2006) Ontogeny of PACAP receptors in the human cerebellum: perspectives of therapeutic applications. *Regul. Pept.* 137(1-2):27-33.
- Basille M, Gonzalez BJ, Fournier A & Vaudry H (1994) Ontogeny of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptors in the rat cerebellum: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 82(1-2):81-89.
- Basu A & Haldar S (1998) The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol. Hum. Reprod.* 4(12):1099-1109.
- Batlevi Y & La Spada AR (2011) Mitochondrial autophagy in neural function, neurodegenerative disease, neuron cell death, and aging. *Neurobiology of disease* 43(1):46-51.
- Battisti C, Formichi P, Radi E & Federico A (2008) Oxidative-stress-induced apoptosis in PBLs of two patients with Parkinson disease secondary to alpha-synuclein mutation. *J Neurol Sci* 267(1-2):120-124.
- Beal MF (1995) Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annals of neurology* 38(3):357-366.
- Beal MF (1998) Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann. Neurol.* 44(3 Suppl 1):S110-114.
- Benabid AL, Le Bas JF & Pollak P (2003) [Therapeutic and physiopathological contribution of electric stimulation of deep brain structures in Parkinson's disease]. *Bull. Acad. Natl. Med.* 187(2):305-319; discussion 319-322.
- Benabid AL, Pollak P, Gross C, Hoffmann D, Benazzouz A, Gao DM, Laurent A, Gentil M & Perret J (1994) Acute and long-term effects of subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease. *Stereotact. Funct. Neurosurg.* 62(1-4):76-84.
- Benes FM (2001) Carlsson and the discovery of dopamine. *Trends Pharmacol. Sci.* 22(1):46-47.
- Bernstein AI & O'Malley KL (2013) MPP⁺-induces PUMA- and p53-dependent, but ATF3-independent cell death. *Toxicology letters* 219(2):93-98.
- Bertler A & Rosengren E (1959) Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia* 15(1):10-11.
- Betarbet R, Sherer TB & Greenamyre JT (2002) Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays* 24(4):308-318.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV & Greenamyre JT (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 3(12):1301-1306.
- Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A, Sofi MA & Ganje SA (2015) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed. Pharmacother.* 74:101-110.
- Bhattacharjee N & Borah A (2016) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction are the underlying events of dopaminergic neurodegeneration in homocysteine rat model of Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* 101:48-55.

- Bhave SV & Hoffman PL (2004) Phosphatidylinositol 3'-OH kinase and protein kinase A pathways mediate the anti-apoptotic effect of pituitary adenyl cyclase-activating polypeptide in cultured cerebellar granule neurons: modulation by ethanol. *J. Neurochem.* 88(2):359-369.
- Bianco CL, Ridet J, Schneider B, Deglon N & Aebischer P (2002) α -Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(16):10813-10818.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S & Kalayci O (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 5(1):9-19.
- Birk S, Sitarz JT, Petersen KA, Oturai PS, Kruuse C, Fahrenkrug J & Olesen J (2007) The effect of intravenous PACAP38 on cerebral hemodynamics in healthy volunteers. *Regul. Pept.* 140(3):185-191.
- Birkmayer W & Hornykiewicz O (1961) [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]. *Wien Klin Wochenschr* 73:787-788.
- Bjorkoy G, Lamark T, Pankiv S, Overvatn A, Brech A & Johansen T (2009) Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol.* 452:181-197.
- Blandini F (2010) An update on the potential role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Funct. Neurol.* 25(2):65-71.
- Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V & Przedborski S (2012) Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol* 2012:845618.
- Blesa J & Przedborski S (2014) Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front. Neuroanat.* 8:155.
- Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelarova H & Meijer AJ (1997) The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 243(1-2):240-246.
- Bonaventura G, Iemmolo R, D'Amico AG, La Cognata V, Costanzo E, Zappia M, D'Agata V, Conforti FL, Aronica E & Cavallaro S (2018) PACAP and PAC1R are differentially expressed in motor cortex of amyotrophic lateral sclerosis patients and support survival of iPSC-derived motor neurons. *Journal of cellular physiology* 233(4):3343-3351.
- Botia B, Basille M, Allais A, Raoult E, Falluel-Morel A, Galas L, Jolivel V, Wurtz O, Komuro H, Fournier A, Vaudry H, Burel D, Gonzalez BJ & Vaudry D (2007) Neurotrophic effects of PACAP in the cerebellar cortex. *Peptides* 28(9):1746-1752.
- Bourgault S, Vaudry D, Botia B, Couvineau A, Laburthe M, Vaudry H & Fournier A (2008a) Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides* 29(6):919-932.
- Bourgault S, Vaudry D, Dejda A, Doan ND, Vaudry H & Fournier A (2009a) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: focus on structure-activity relationships of a neuroprotective Peptide. *Curr. Med. Chem.* 16(33):4462-4480.
- Bourgault S, Vaudry D, Guilhaudis L, Raoult E, Couvineau A, Laburthe M, Segalas-Milazzo I, Vaudry H & Fournier A (2008b) Biological and structural analysis of truncated analogs of PACAP27. *J. Mol. Neurosci.* 36(1-3):260-269.
- Bourgault S, Vaudry D, Segalas-Milazzo I, Guilhaudis L, Couvineau A, Laburthe M, Vaudry H & Fournier A (2009b) Molecular and conformational determinants of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) for activation of the PAC1 receptor. *J. Med. Chem.* 52(10):3308-3316.

- Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H & Del Tredici K (2004) Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* 318(1):121-134.
- Bredesen DE, Rao RV & Mehlen P (2006) Cell death in the nervous system. *Nature* 443(7113):796-802.
- Brifault C, Gras M, Liot D, May V, Vaudry D & Wurtz O (2015) Delayed pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide delivery after brain stroke improves functional recovery by inducing M2 microglia/macrophage polarization. *Stroke* 46(2):520-528.
- Brochard V, Combadière B, Prigent A, Laouar Y, Perrin A, Beray-Berthat V, Bonduelle O, Alvarez-Fischer D, Callebert J & Launay J-M (2008) Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *The Journal of clinical investigation* 119(1). 182-192.
- Brooks A, Chadwick C, Gelbard H, Cory-Slechta D & Federoff H (1999) Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain research* 823(1-2):1-10.
- Brouillet E & Beal MF (1993) NMDA antagonists partially protect against MPTP induced neurotoxicity in mice. *Neuroreport* 4(4):387-390.
- Brown D, Tamas A, Reglodi D & Tizabi Y (2013) PACAP protects against salsolinol-induced toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells: implication for Parkinson's disease. *Journal of molecular neuroscience : MN* 50(3):600-607.
- Brown D, Tamas A, Reglodi D & Tizabi Y (2014) PACAP protects against inflammatory-mediated toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells: implication for Parkinson's disease. *Neurotoxicity research* 26(3):230-239.
- Bulteau AL, Mena NP, Auchere F, Lee I, Prigent A, Lobsiger CS, Camadro JM & Hirsch EC (2017) Dysfunction of mitochondrial Lon protease and identification of oxidized protein in mouse brain following exposure to MPTP: Implications for Parkinson disease. *Free Radic. Biol. Med.* 108:236-246.
- Bureau G, Longpre F & Martinoli MG (2008) Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. *J. Neurosci. Res.* 86(2):403-410.
- Burns RS, Markey SP, Phillips JM & Chiueh CC (1984) The neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the monkey and man. *Can. J. Neurol. Sci.* 11(1 Suppl):166-168.
- Bursch W (2001) The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 8(6):569-581.
- Busto R, Prieto JC, Bodega G, Zapatero J & Carrero I (2000) Immunohistochemical localization and distribution of VIP/PACAP receptors in human lung. *Peptides* 21(2):265-269.
- Campbell BC, McLean CA, Culvenor JG, Gai WP, Blumbergs PC, Jakala P, Beyreuther K, Masters CL & Li QX (2001) The solubility of alpha-synuclein in multiple system atrophy differs from that of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease. *J Neurochem* 76(1):87-96.
- Carlsson A, Lindqvist M & Magnusson T (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180(4596):1200.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T & Waldeck B (1958) On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* 127(3296):471.
- Caro LH, Plomp PJ, Wolvetang EJ, Kerkhof C & Meijer AJ (1988) 3-Methyladenine, an inhibitor of autophagy, has multiple effects on metabolism. *Eur. J. Biochem.* 175(2):325-329.

- Carson MJ, Thrash JC & Walter B (2006) The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. *Clin. Neurosci. Res.* 6(5):237-245.
- Casarejos MJ, Menendez J, Solano RM, Rodriguez-Navarro JA, Garcia de Yebenes J & Mena MA (2006) Susceptibility to rotenone is increased in neurons from parkin null mice and is reduced by minocycline. *J. Neurochem.* 97(4):934-946.
- Caudle WM & Zhang J (2009) Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease. *Exp. Neurol.* 220(2):230-233.
- Chan-Palay V (1991) Alterations in the locus coeruleus in dementias of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 88:625-630.
- Chang HY & Yang X (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4):821-846.
- Chang JY, Korolev VV & Wang JZ (1996) Cyclic AMP and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevent programmed cell death of cultured rat cerebellar granule cells. *Neurosci. Lett.* 206(2-3):181-184.
- Chang YY & Neufeld TP (2009) An Atg1/Atg13 complex with multiple roles in TOR-mediated autophagy regulation. *Mol. Biol. Cell* 20(7):2004-2014.
- Chen WW, Zhang X & Huang WJ (2016) Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Molecular medicine reports* 13(4):3391-3396.
- Chen Y, Samal B, Hamelink CR, Xiang CC, Chen Y, Chen M, Vaudry D, Brownstein MJ, Hallenbeck JM & Eiden LE (2006) Neuroprotection by endogenous and exogenous PACAP following stroke. *Regul. Pept.* 137(1-2):4-19.
- Cherra SJ, 3rd & Chu CT (2008) Autophagy in neuroprotection and neurodegeneration: A question of balance. *Future Neurol* 3(3):309-323.
- Cherra SJ, 3rd, Kulich SM, Uechi G, Balasubramani M, Mountzouris J, Day BW & Chu CT (2010) Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *J. Cell Biol.* 190(4):533-539.
- Cheung ZH & Ip NY (2009) The emerging role of autophagy in Parkinson's disease. *Molecular brain* 2:29.
- Chinni SR & Shisheva A (1999) Arrest of endosome acidification by bafilomycin A1 mimics insulin action on GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. J.* 339 (Pt 3):599-606.
- Chiocco MJ, Harvey BK, Wang Y & Hoffer BJ (2007) Neurotrophic factors for the treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 13 Suppl 3:S321-328.
- Chiueh CC, Markey SP, Burns RS, Johannessen JN, Jacobowitz DM & Kopin IJ (1984) Neurochemical and behavioral effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in rat, guinea pig, and monkey. *Psychopharmacol. Bull.* 20(3):548-553.
- Choi DW (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1(8):623-634.
- Chu CT (2006) Autophagic stress in neuronal injury and disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65(5):423-432.
- Chung CY, Seo H, Sonntag KC, Brooks A, Lin L & Isacson O (2005a) Cell type-specific gene expression of midbrain dopaminergic neurons reveals molecules involved in their vulnerability and protection. *Human molecular genetics* 14(13):1709-1725.

- Chung CY, Seo H, Sonntag KC, Brooks A, Lin L & Isacson O (2005b) Cell type-specific gene expression of midbrain dopaminergic neurons reveals molecules involved in their vulnerability and protection. *Human molecular genetics* 14(13):1709-1725.
- Cicchetti F, Brownell AL, Williams K, Chen YI, Livni E & Isacson O (2002) Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *Eur. J. Neurosci.* 15(6):991-998.
- Cicchetti F, Lapointe N, Roberge-Tremblay A, Saint-Pierre M, Jimenez L, Ficke BW & Gross RE (2005) Systemic exposure to paraquat and maneb models early Parkinson's disease in young adult rats. *Neurobiology of disease* 20(2):360-371.
- Cirino PC, Tang Y, Takahashi K, Tirrell DA & Arnold FH (2003) Global incorporation of norleucine in place of methionine in cytochrome P450 BM-3 heme domain increases peroxygenase activity. *Biotechnol. Bioeng.* 83(6):729-734.
- Cleeter MW, Cooper JM & Schapira AH (1992) Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. *J. Neurochem.* 58(2):786-789.
- Codolo G, Plotegher N, Pozzobon T, Brucale M, Tessari I, Bubacco L & de Bernard M (2013) Triggering of inflammasome by aggregated alpha-synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies. *PLoS One* 8(1):e55375.
- Colangelo AM, Alberghina L & Papa M (2014) Astroglialosis as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Neurosci. Lett.* 565:59-64.
- Concannon CG, Ward MW, Bonner HP, Kuroki K, Tuffy LP, Bonner CT, Woods I, Engel T, Henshall DC & Prehn JH (2008) NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal apoptosis in vitro and in vivo occurs in an ER stress and PUMA independent manner. *J. Neurochem.* 105(3):891-903.
- Cotzias GC, Van Woert MH & Schiffer LM (1967) Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N. Engl. J. Med.* 276(7):374-379.
- Da Costa CA & Checler F (2011) Apoptosis in Parkinson's disease: is p53 the missing link between genetic and sporadic Parkinsonism? *Cellular signalling* 23(6):963-968.
- Dagda RK, Cherra SJ, 3rd, Kulich SM, Tandon A, Park D & Chu CT (2009) Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *J. Biol. Chem.* 284(20):13843-13855.
- Daher JPL, Ying M, Banerjee R, McDonald RS, Hahn MD, Yang L, Beal MF, Thomas B, Dawson VL & Dawson TM (2009) Conditional transgenic mice expressing C-terminally truncated human α -synuclein (α Syn119) exhibit reduced striatal dopamine without loss of nigrostriatal pathway dopaminergic neurons. *Molecular neurodegeneration* 4(1):34.
- Damier P, Hirsch EC, Zhang P, Agid Y & Javoy-Agid F (1993) Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* 52(1):1-6.
- Darios F, Corti O, Lucking CB, Hampe C, Muriel MP, Abbas N, Gu WJ, Hirsch EC, Rooney T, Ruberg M & Brice A (2003) Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Hum. Mol. Genet.* 12(5):517-526.
- Darsalia V, Mansouri S, Wolbert P, Barde S, Sjöholm A & Patrone C (2013) The specific VPAC2 agonist Bay 55-9837 increases neuronal damage and hemorrhagic transformation after stroke in type 2 diabetic rats. *Neuropeptides* 47(2):133-137.

- Das M, Vihlen CS & Legradi G (2007) Hypothalamic and brainstem sources of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide nerve fibers innervating the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 500(4):761-776.
- Dauer W & Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39(6):889-909.
- Dave KD, De Silva S, Sheth NP, Ramboz S, Beck MJ, Quang C, Switzer III RC, Ahmad SO, Sunkin SM & Walker D (2014) Phenotypic characterization of recessive gene knockout rat models of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* 70:190-203.
- Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM & Kopin IJ (1979) Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry research* 1(3):249-254.
- Dawson TM & Dawson VL (2010) The role of parkin in familial and sporadic Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 25 Suppl 1:S32-39.
- Day RM & Suzuki YJ (2006) Cell proliferation, reactive oxygen and cellular glutathione. *Dose Response* 3(3):425-442.
- de la Monte SM, Sohn YK, Ganju N & Wands JR (1998) P53- and CD95-associated apoptosis in neurodegenerative diseases. *Lab. Invest.* 78(4):401-411.
- Deas E, Wood NW & Plun-Favreau H (2011) Mitophagy and Parkinson's disease: the PINK1-parkin link. *Biochim. Biophys. Acta* 1813(4):623-633.
- Deguil J, Chavant F, Lafay-Chebassier C, Perault-Pochat MC, Fauconneau B & Pain S (2010) Neuroprotective effect of PACAP on translational control alteration and cognitive decline in MPTP parkinsonian mice. *Neurotox. Res.* 17(2):142-155.
- Deguil J, Jailloux D, Page G, Fauconneau B, Houeto JL, Philippe M, Muller JM & Pain S (2007) Neuroprotective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in MPP+-induced alteration of translational control in Neuro-2a neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.* 85(9):2017-2025.
- Dehay B & Bezard E (2011) New animal models of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 26(7):1198-1205.
- Dehay B, Bove J, Rodriguez-Muela N, Perier C, Recasens A, Boya P & Vila M (2010) Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 30(37):12535-12544.
- Dejda A, Seaborn T, Bourgault S, Touzani O, Fournier A, Vaudry H & Vaudry D (2011) PACAP and a novel stable analog protect rat brain from ischemia: Insight into the mechanisms of action. *Peptides* 32(6):1207-1216.
- Dejda A, Sokolowska P & Nowak JZ (2005) Neuroprotective potential of three neuropeptides PACAP, VIP and PHI. *Pharmacol. Rep.* 57(3):307-320.
- Delgado M, Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Leceta J, Ganea D & Gomariz RP (2003a) PACAP in immunity and inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 992:141-157.
- Delgado M & Ganea D (2003b) Neuroprotective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) in a mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. *FASEB J.* 17(8):944-946.
- Delgado M & Ganea D (2003c) Vasoactive intestinal peptide prevents activated microglia-induced neurodegeneration under inflammatory conditions: potential therapeutic role in brain trauma. *FASEB J.* 17(13):1922-1924.

- Delgado M, Jonakait GM & Ganea D (2002) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit chemokine production in activated microglia. *Glia* 39(2):148-161.
- Delgado M, Martinez C, Pozo D, Calvo JR, Leceta J, Ganea D & Gomariz RP (1999) Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activation polypeptide (PACAP) protect mice from lethal endotoxemia through the inhibition of TNF-alpha and IL-6. *J. Immunol.* 162(2):1200-1205.
- DeMarch Z, Giampà C, Patassini S, Bernardi G & Fusco FR (2008) Beneficial effects of rolipram in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of disease* 30(3):375-387.
- Depboylu C, Stricker S, Ghobril JP, Oertel WH, Priller J & Hoglinger GU (2012) Brain-resident microglia predominate over infiltrating myeloid cells in activation, phagocytosis and interaction with T-lymphocytes in the MPTP mouse model of Parkinson disease. *Exp. Neurol.* 238(2):183-191.
- Dhalla NS, Temsah RM & Netticadan T (2000) Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J. Hypertens.* 18(6):655-673.
- Dhanasekaran DN & Reddy EP (2008) JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27(48):6245-6251.
- Dhein J, Walczak H, Westendorp MO, Baumler C, Stricker K, Frank R, Debatin KM & Krammer PH (1995) Molecular mechanisms of APO-1/Fas(CD95)-mediated apoptosis in tolerance and AIDS. *Behring Inst. Mitt.* (96):13-20.
- Dias V, Junn E & Mouradian MM (2013) The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J. Parkinsons Dis.* 3(4):461-491.
- Djaldetti R & Melamed E (2002) New drugs in the future treatment of Parkinson's disease. *J Neurol* 249 Suppl 2:II30-35.
- Do Van B, Gouel F, Jonneaux A, Timmerman K, Gele P, Petrault M, Bastide M, Laloux C, Moreau C, Bordet R, Devos D & Devedjian JC (2016) Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson's disease that is regulated by PKC. *Neurobiol. Dis.* 94:169-178.
- Doan ND, Bourgault S, Dejda A, Letourneau M, Detheux M, Vaudry D, Vaudry H, Chatenet D & Fournier A (2011) Design and in vitro characterization of PAC1/VPAC1-selective agonists with potent neuroprotective effects. *Biochem. Pharmacol.* 81(4):552-561.
- Dogrukol-Ak D, Kumar VB, Ryerse JS, Farr SA, Verma S, Nonaka N, Nakamachi T, Ohtaki H, Niehoff ML, Edwards JC, Shioda S, Morley JE & Banks WA (2009) Isolation of peptide transport system-6 from brain endothelial cells: therapeutic effects with antisense inhibition in Alzheimer and stroke models. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29(2):411-422.
- Dogrukol-Ak D, Tore F & Tuncel N (2004) Passage of VIP/PACAP/secretin family across the blood-brain barrier: therapeutic effects. *Current pharmaceutical design* 10(12):1325-1340.
- Dohi K, Mizushima H, Nakajo S, Ohtaki H, Matsunaga S, Aruga T & Shioda S (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevents hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. *Regulatory peptides* 109(1-3):83-88.
- Domercq M, Vazquez-Villoldo N & Matute C (2013) Neurotransmitter signaling in the pathophysiology of microglia. *Front. Cell. Neurosci.* 7:49.
- Dong XX, Wang Y & Qin ZH (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* 30(4):379-387.
- Douiri S, Bahdoudi S, Hamdi Y, Cubi R, Basille M, Fournier A, Vaudry H, Tonon MC, Amri M, Vaudry D & Masmoudi-Kouki O (2016) Involvement of endogenous antioxidant systems in the protective

- activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide against hydrogen peroxide-induced oxidative damages in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* 137(6):913-930.
- Dunn WA, Jr. (1994) Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.* 4(4):139-143.
- Duty S & Jenner P (2011) Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br. J. Pharmacol.* 164(4):1357-1391.
- Eberling JL, Jagust WJ, Christine CW, Starr P, Larson P, Bankiewicz KS & Aminoff MJ (2008) Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* 70(21):1980-1983.
- Ehringer H & Hornykiewicz O (1960) [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin. Wochenschr.* 38:1236-1239.
- Ekert PG, Silke J, Hawkins CJ, Verhagen AM & Vaux DL (2001) DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9. *J. Cell Biol.* 152(3):483-490.
- El Massri N, Moro C, Torres N, Darlot F, Agay D, Chabrol C, Johnstone DM, Stone J, Benabid AL & Mitrofanis J (2016) Near-infrared light treatment reduces astrogliosis in MPTP-treated monkeys. *Exp. Brain Res.* 234(11):3225-3232.
- Elbaz A, Clavel J, Rathouz PJ, Moisan F, Galanaud JP, Delemotte B, Alperovitch A & Tzourio C (2009) Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 66(4):494-504.
- Emerit J, Edeas M & Bricaire F (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 58(1):39-46.
- Erickson MA, Dohi K & Banks WA (2012) Neuroinflammation: a common pathway in CNS diseases as mediated at the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation* 19(2):121-130.
- Farnham MM, Ingloft MA & Pilowsky PM (2011) Intrathecal PACAP-38 causes increases in sympathetic nerve activity and heart rate but not blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 300(1):H214-222.
- Filipsson K, Pacini G, Scheurink AJ & Ahren B (1998) PACAP stimulates insulin secretion but inhibits insulin sensitivity in mice. *Am. J. Physiol.* 274(5 Pt 1):E834-842.
- Filipsson K, Tornoe K, Holst J & Ahren B (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates insulin and glucagon secretion in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82(9):3093-3098.
- Finkel T & Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408(6809):239-247.
- Fizanne L, Sigauco-Roussel D, Saumet JL & Fromy B (2004) Evidence for the involvement of VPAC1 and VPAC2 receptors in pressure-induced vasodilatation in rodents. *J. Physiol.* 554(Pt 2):519-528.
- Forno LS, DeLanney LE, Irwin I, Di Monte D & Langston JW (1992) Astrocytes and Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.* 94:429-436.
- Forno LS, Langston JW, DeLanney LE & Irwin I (1988) An electron microscopic study of MPTP-induced inclusion bodies in an old monkey. *Brain Res.* 448(1):150-157.
- Fournier A, Bourgault S & Chatenet D (2016) The Pharmacophoric Determinants of PACAP. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide—PACAP*, Springer. p 111-132.
- Fraix V (2004) [Gene therapy for Parkinson's disease]. *Rev. Med. Interne* 25(7):524-527.

- Frake RA, Ricketts T, Menzies FM & Rubinsztein DC (2015) Autophagy and neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* 125(1):65-74.
- Frank-Cannon TC, Tran T, Ruhn KA, Martinez TN, Hong J, Marvin M, Hartley M, Trevino I, O'Brien DE, Casey B, Goldberg MS & Tansey MG (2008) Parkin deficiency increases vulnerability to inflammation-related nigral degeneration. *J. Neurosci.* 28(43):10825-10834.
- Frechilla D, Garcia-Osta A, Palacios S, Cenarruzabeitia E & Del Rio J (2001) BDNF mediates the neuroprotective effect of PACAP-38 on rat cortical neurons. *Neuroreport* 12(5):919-923.
- Friedlander RM (2003) Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N. Engl. J. Med.* 348(14):1365-1375.
- Friguet B (2006) Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *FEBS Lett.* 580(12):2910-2916.
- Fujiwara Y, Furuta A, Kikuchi H, Aizawa S, Hatanaka Y, Konya C, Uchida K, Yoshimura A, Tamai Y, Wada K & Kabuta T (2013) Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy* 9(3):403-409.
- Fukae J, Mizuno Y & Hattori N (2007) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Mitochondrion* 7(1-2):58-62.
- Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S & Obata F (2002) A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11. 2–q13. 1. *Annals of neurology* 51(3):296-301.
- Furman JL & Norris CM (2014) Calcineurin and glial signaling: neuroinflammation and beyond. *J. Neuroinflammation* 11:158.
- Furuya N, Yu J, Byfield M, Pattingre S & Levine B (2005) The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. *Autophagy* 1(1):46-52.
- Ganley IG (2013) Autophagosome maturation and lysosomal fusion. *Essays Biochem.* 55:65-78.
- Garcia E, Villeda-Hernandez J, Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD & Santamaria A (2010) S-allylcysteine reduces the MPTP-induced striatal cell damage via inhibition of pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase expressions in mice. *Phytomedicine* 18(1):65-73.
- Gebicki JM (2016) Oxidative stress, free radicals and protein peroxides. *Arch. Biochem. Biophys.* 595:33-39.
- Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, Hammers A, Eggert K, Oertel W, Banati RB & Brooks DJ (2006) In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 21(2):404-412.
- Ghatei MA, Takahashi K, Suzuki Y, Gardiner J, Jones PM & Bloom SR (1993) Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursor encoding messenger RNA in human and rat tissues. *J. Endocrinol.* 136(1):159-166.
- Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M, Christoffersson J, Chaabane W, Moghadam AR, Kashani HH, Hashemi M, Owji AA & Los MJ (2014) Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog. Neurobiol.* 112:24-49.
- Gimenez-Xavier P, Francisco R, Platini F, Perez R & Ambrosio S (2008) LC3-I conversion to LC3-II does not necessarily result in complete autophagy. *Int. J. Mol. Med.* 22(6):781-785.

- Goetz CG (2011) The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1(1):a008862.
- Gomez-Santos C, Ferrer I, Santidrian AF, Barrachina M, Gil J & Ambrosio S (2003) Dopamine induces autophagic cell death and alpha-synuclein increase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neurosci. Res.* 73(3):341-350.
- Gong B, Vitolo OV, Trinchese F, Liu S, Shelanski M & Arancio O (2004) Persistent improvement in synaptic and cognitive functions in an Alzheimer mouse model after rolipram treatment. *The Journal of clinical investigation* 114(11):1624-1634.
- Gonzalez-Muniz R, Martin-Martinez M, Granata C, de Oliveira E, Santiveri CM, Gonzalez C, Frechilla D, Herranz R, Garcia-Lopez MT, Del Rio J, Angeles Jimenez M & Andreu D (2001) Conformationally restricted PACAP27 analogues incorporating type II/II' IBTM beta-turn mimetics. Synthesis, NMR structure determination, and binding affinity. *Bioorg. Med. Chem.* 9(12):3173-3183.
- Gonzalez BJ, Basille M, Mei YA, Vaudry D, Fournier A, Cazin L & Vaudry H (1996) Ontogeny of PACAP and PACAP receptors in the rat brain: role of PACAP in the cerebellum during development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 805:302-313; discussion 313-304.
- Gottschall PE, Tatsuno I & Arimura A (1994) Regulation of interleukin-6 (IL-6) secretion in primary cultured rat astrocytes: synergism of interleukin-1 (IL-1) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Brain Res.* 637(1-2):197-203.
- Gourlet P, Vandermeers A, Van Rampelbergh J, De Neef P, Cnudde J, Waelbroeck M & Robberecht P (1998) Analogues of VIP, helodermin, and PACAP discriminate between rat and human VIP1 and VIP2 receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 865:247-252.
- Gourlet P, Vandermeers A, Vandermeers-Piret MC, Rathe J, De Neef P & Robberecht P (1995) Fragments of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide discriminate between type I and II recombinant receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 287(1):7-11.
- Grant S, Lutz EM, McPhaden AR & Wadsworth RM (2006) Location and function of VPAC1, VPAC2 and NPR-C receptors in VIP-induced vasodilation of porcine basilar arteries. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 26(1):58-67.
- Green BD, Irwin N & Flatt PR (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP): assessment of dipeptidyl peptidase IV degradation, insulin-releasing activity and antidiabetic potential. *Peptides* 27(6):1349-1358.
- Green DR & Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281(5381):1309-1312.
- Gui LR, Zhou Y, Zhang BL & Li WB (2003) [Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects neuro-2a cells from beta amyloid protein cytotoxicity by modulating intracellular calcium]. *Sheng Li Xue Bao* 55(1):42-46.
- Guillot TS, Richardson JR, Wang MZ, Li YJ, Taylor TN, Ciliax BJ, Zachrisson O, Mercer A & Miller GW (2008) PACAP38 increases vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) expression and attenuates methamphetamine toxicity. *Neuropeptides* 42(4):423-434.
- Guiney SJ, Adlard PA, Bush AI, Finkelstein DI & Ayton S (2017) Ferroptosis and cell death mechanisms in Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* 104:34-48.
- Hamani C & Lozano AM (2003) Physiology and pathophysiology of Parkinson's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 991:15-21.

- Hannibal J (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Journal of Comparative Neurology* 453(4):389-417.
- Hannibal J, Mikkelsen JD, Clausen H, Holst JJ, Wulff BS & Fahrenkrug J (1995) Gene expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat hypothalamus. *Regul. Pept.* 55(2):133-148.
- Hanrott K, Gudmunsen L, O'Neill MJ & Wonnacott S (2006) 6-hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase C δ . *Journal of Biological Chemistry* 281(9):5373-5382.
- Hardie DG, Ross FA & Hawley SA (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13(4):251-262.
- Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said SI, Sreedharan SP, Wank SA & Waschek JA (1998) International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol. Rev.* 50(2):265-270.
- Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Turmel H, Srinivasan A, Ruberg M, Evan GI, Agid Y & Hirsch EC (2000) Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(6):2875-2880.
- Hartmann A, Mouatt-Prigent A, Vila M, Abbas N, Perier C, Faucheux BA, Vyas S & Hirsch EC (2002) Increased expression and redistribution of the antiapoptotic molecule Bcl-xL in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 10(1):28-32.
- Hartmann A, Troadec JD, Hunot S, Kikly K, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Agid Y & Hirsch EC (2001) Caspase-8 is an effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, but pathway inhibition results in neuronal necrosis. *J. Neurosci.* 21(7):2247-2255.
- Hashimoto H, Nogi H, Mori K, Ohishi H, Shigemoto R, Yamamoto K, Matsuda T, Mizuno N, Nagata S & Baba A (1996) Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 371(4):567-577.
- Hastings TG (2009) The role of dopamine oxidation in mitochondrial dysfunction: implications for Parkinson's disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41(6):469-472.
- Hattori N, Machida Y & Noda K (2005) [Pathogenesis of Parkinson's disease: a common pathway between alpha-synuclein and parkin and the mechanism of Lewy bodies formation]. *Rinsho Shinkeigaku.* 45(11):905-907.
- Heikkila RE, Hess A & Duvoisin RC (1984) Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 224(4656):1451-1453.
- Hemelaar J, Lelyveld VS, Kessler BM & Ploegh HL (2003) A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *J. Biol. Chem.* 278(51):51841-51850.
- Hensley K & Harris-White ME (2015) Redox regulation of autophagy in healthy brain and neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 84:50-59.

- Heo JY, Park JH, Kim SJ, Seo KS, Han JS, Lee SH, Kim JM, Park JI, Park SK, Lim K, Hwang BD, Shong M & Kweon GR (2012) DJ-1 null dopaminergic neuronal cells exhibit defects in mitochondrial function and structure: involvement of mitochondrial complex I assembly. *PLoS One* 7(3):e32629.
- Herrera AJ, Espinosa-Oliva AM, Carrillo-Jimenez A, Oliva-Martin MJ, Garcia-Revilla J, Garcia-Quintanilla A, de Pablos RM & Venero JL (2015) Relevance of chronic stress and the two faces of microglia in Parkinson's disease. *Front. Cell. Neurosci.* 9:312.
- Hindle JV (2010) Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Age Ageing* 39(2):156-161.
- Hirsch EC & Hunot S (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol.* 8(4):382-397.
- Hoare SR (2005) Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors. *Drug Discov. Today* 10(6):417-427.
- Hochfeld WE, Lee S & Rubinsztein DC (2013) Therapeutic induction of autophagy to modulate neurodegenerative disease progression. *Acta pharmacologica Sinica* 34(5):600-604.
- Hoehn MM & Yahr MD (1967) Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 17(5):427-442.
- Hornykiewicz O (2010) A brief history of levodopa. *J. Neurol.* 257(Suppl 2):S249-252.
- Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N & Mizushima N (2009) Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* 20(7):1981-1991.
- Hosoya M, Kimura C, Ogi K, Ohkubo S, Miyamoto Y, Kugoh H, Shimizu M, Onda H, Oshimura M, Arimura A & et al. (1992) Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1129(2):199-206.
- Howell JJ & Manning BD (2011) mTOR couples cellular nutrient sensing to organismal metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* 22(3):94-102.
- Hu Q & Wang G (2016) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Transl Neurodegener* 5:14.
- Hugon J, Vallat JM & Dumas M (1996) [Role of glutamate and excitotoxicity in neurologic diseases]. *Rev. Neurol. (Paris)* 152(4):239-248.
- Hung KC, Huang HJ, Lin MW, Lei YP & Lin AM (2014) Roles of autophagy in MPP⁺-induced neurotoxicity in vivo: the involvement of mitochondria and alpha-synuclein aggregation. *PLoS One* 9(3):e91074.
- Hung KC, Huang HJ, Wang YT & Lin AM (2016) Baicalein attenuates alpha-synuclein aggregation, inflammasome activation and autophagy in the MPP⁺-treated nigrostriatal dopaminergic system in vivo. *J. Ethnopharmacol.* 194:522-529.
- Hurley JH & Young LN (2017) Mechanisms of Autophagy Initiation. *Annu. Rev. Biochem.* 10.1146/annurev-biochem-061516-044820.
- Hwang O (2013) Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp. Neurobiol.* 22(1):11-17.
- Ichimura Y & Komatsu M (2010) Selective degradation of p62 by autophagy. *Semin. Immunopathol.* 32(4):431-436.
- Ichinose M, Asai M, Imai K & Sawada M (1995) Enhancement of phagocytosis in mouse macrophages by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and related peptides. *Immunopharmacology* 30(3):217-224.

- Ikebe S, Tanaka M, Ohno K, Sato W, Hattori K, Kondo T, Mizuno Y & Ozawa T (1990) Increase of deleted mitochondrial DNA in the striatum in Parkinson's disease and senescence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170(3):1044-1048.
- Inooka H, Endo S, Kitada C, Mizuta E & Fujino M (1992) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) with 27 residues. Conformation determined by ¹H NMR and CD spectroscopies and distance geometry in 25% methanol solution. *Int. J. Pept. Protein Res.* 40(5):456-464.
- Inooka H, Ohtaki T, Kitahara O, Ikegami T, Endo S, Kitada C, Ogi K, Onda H, Fujino M & Shirakawa M (2001) Conformation of a peptide ligand bound to its G-protein coupled receptor. *Nat. Struct. Biol.* 8(2):161-165.
- Ishida Y, Nagai A, Kobayashi S & Kim SU (2006) Upregulation of protease-activated receptor-1 in astrocytes in Parkinson disease: astrocyte-mediated neuroprotection through increased levels of glutathione peroxidase. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65(1):66-77.
- Ishizaki F, Harada T, Yoshinaga H, Nakayama T, Yamamura Y & Nakamura S (1996) [Prolonged QTc intervals in Parkinson's disease--relation to sudden death and autonomic dysfunction]. *No To Shinkei* 48(5):443-448.
- Ishizuka Y, Kashimoto K, Mochizuki T, Sato K, Ohshima K & Yanaihara N (1992) Cardiovascular and respiratory actions of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides. *Regul. Pept.* 40(1):29-39.
- Islam MT (2017) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol. Res.* 39(1):73-82.
- Itakura E, Kishi C, Inoue K & Mizushima N (2008) Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol. Biol. Cell* 19(12):5360-5372.
- Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A & Hall MN (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.* 6(11):1122-1128.
- Jagmag SA, Tripathi N, Shukla SD, Maiti S & Khurana S (2016) Evaluation of models of Parkinson's disease. *Frontiers in neuroscience* 9:503.
- Jamen F, Puech R, Bockaert J, Brabet P & Bertrand G (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors mediating insulin secretion in rodent pancreatic islets are coupled to adenylate cyclase but not to PLC. *Endocrinology* 143(4):1253-1259.
- Jana S, Sinha M, Chanda D, Roy T, Banerjee K, Munshi S, Patro BS & Chakrabarti S (2011) Mitochondrial dysfunction mediated by quinone oxidation products of dopamine: Implications in dopamine cytotoxicity and pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1812(6):663-673.
- Janda E, Isidoro C, Carresi C & Mollace V (2012) Defective autophagy in Parkinson's disease: role of oxidative stress. *Mol. Neurobiol.* 46(3):639-661.
- Janetzky B, Hauck S, Youdim MB, Riederer P, Jellinger K, Pantucek F, Zochling R, Boissl KW & Reichmann H (1994) Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 169(1-2):126-128.
- Jankovic J (2005) Searching for a relationship between manganese and welding and Parkinson's disease. *Neurology* 64(12):2021-2028.

- Jenner P, Dexter DT, Sian J, Schapira AH & Marsden CD (1992) Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. *Ann. Neurol.* 32 Suppl:S82-87.
- Jia G, Cheng G, Gangahar DM & Agrawal DK (2006) Insulin-like growth factor-1 and TNF-alpha regulate autophagy through c-jun N-terminal kinase and Akt pathways in human atherosclerotic vascular smooth cells. *Immunol. Cell Biol.* 84(5):448-454.
- Jiang D, Shi S, Zhang L, Liu L, Ding B, Zhao B, Yagnik G & Zhou F (2013) Inhibition of the Fe(III)-catalyzed dopamine oxidation by ATP and its relevance to oxidative stress in Parkinson's disease. *ACS Chem. Neurosci.* 4(9):1305-1313.
- Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS & Markey SP (1985) Differences in the metabolism of MPTP in the rodent and primate parallel differences in sensitivity to its neurotoxic effects. *Life Sci.* 36(3):219-224.
- Journot L, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Seeburg PH, Bockaert J & Spengler D (1995) Differential signal transduction by six splice variants of the pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) receptor. *Biochem. Soc. Trans.* 23(1):133-137.
- Jozwiak-Bebenista M, Bednarek K & Nowak JZ (2008) [The neuroprotective effect of PACAP, VIP, and derivatives in brain ischemia]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 62:478-489.
- Juarez Olguin H, Calderon Guzman D, Hernandez Garcia E & Barragan Mejia G (2016) The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016:9730467.
- Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM & Kim DH (2010) mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* 584(7):1287-1295.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y & Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19(21):5720-5728.
- Kachergus J, Mata IF, Hulihan M, Taylor JP, Lincoln S, Aasly J, Gibson JM, Ross OA, Lynch T, Wiley J, Payami H, Nutt J, Maraganore DM, Czyzewski K, Styczynska M, Wszolek ZK, Farrer MJ & Toft M (2005) Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. *Am. J. Hum. Genet.* 76(4):672-680.
- Kambe Y & Miyata A (2012) Role of mitochondrial activation in PACAP dependent neurite outgrowth. *J. Mol. Neurosci.* 48(3):550-557.
- Kasica N, Podlasz P, Sundvik M, Tamas A, Reglodi D & Kaleczyc J (2016) Protective Effects of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Against Oxidative Stress in Zebrafish Hair Cells. *Neurotox. Res.* 30(4):633-647.
- Katzenschlager R & Lees AJ (2002) Treatment of Parkinson's disease: levodopa as the first choice. *J. Neurol.* 249 Suppl 2:II19-24.
- Kaur J & Debnath J (2015) Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16(8):461-472.
- Kavanagh E, Burguillos MA, Carrillo-Jimenez A, Oliva-Martin MJ, Santiago M, Rodhe J, Joseph B & Venero JL (2015) Deletion of caspase-8 in mouse myeloid cells blocks microglia pro-inflammatory activation and confers protection in MPTP neurodegeneration model. *Aging (Albany NY)* 7(9):673-689.

- Kellogg DL, Jr., Zhao JL, Wu Y & Johnson JM (2012) Nitric oxide and receptors for VIP and PACAP in cutaneous active vasodilation during heat stress in humans. *J Appl Physiol (1985)* 113(10):1512-1518.
- Kerr JF, Wyllie AH & Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26(4):239-257.
- Kesidou E, Lagoudaki R, Touloumi O, Poulatsidou KN & Simeonidou C (2013) Autophagy and neurodegenerative disorders. *Neural Regen Res* 8(24):2275-2283.
- Kiffin R, Bandyopadhyay U & Cuervo AM (2006) Oxidative stress and autophagy. *Antioxidants & redox signaling* 8(1-2):152-162.
- Kim B, Yang MS, Choi D, Kim JH, Kim HS, Seol W, Choi S, Jou I, Kim EY & Joe EH (2012) Impaired inflammatory responses in murine Lrrk2-knockdown brain microglia. *PLoS One* 7(4):e34693.
- Kim J, Kundu M, Viollet B & Guan KL (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13(2):132-141.
- Klein C & Lohmann-Hedrich K (2007) Impact of recent genetic findings in Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol.* 20(4):453-464.
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E & Tanaka K (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441(7095):880-884.
- Kong LY, Maderdrut JL, Jeohn GH & Hong JS (1999) Reduction of lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in mixed cortical neuron/glia cultures by femtomolar concentrations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuroscience* 91(2):493-500.
- Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE & Oltvai ZN (1993) Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin. Cancer Biol.* 4(6):327-332.
- Kowall NW, Hantraye P, Brouillet E, Beal MF, McKee AC & Ferrante RJ (2000) MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *Neuroreport* 11(1):211-213.
- Kraft C, Reggiori F & Peter M (2009) Selective types of autophagy in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1793(9):1404-1412.
- Krantic S, Mechawar N, Reix S & Quirion R (2005) Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 28(12):670-676.
- Lai TW, Zhang S & Wang YT (2014) Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* 115:157-188.
- Lamine A, Letourneau M, Doan ND, Maucotel J, Couvineau A, Vaudry H, Chatenet D, Vaudry D & Fournier A (2016) Characterizations of a synthetic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide analog displaying potent neuroprotective activity and reduced in vivo cardiovascular side effects in a Parkinson's disease model. *Neuropharmacology* 108:440-450.
- Langer I (2012) Mechanisms involved in VPAC receptors activation and regulation: lessons from pharmacological and mutagenesis studies. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 3:129.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW & Irwin I (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219(4587):979-980.

- Langston JW, Langston EB & Irwin I (1984) MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates--clinical and experimental aspects. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 100:49-54.
- Lapointe N, St-Hilaire M, Martinoli M-G, Blanchet J, Gould P, Rouillard C & Cicchetti F (2004) Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity. *The FASEB journal* 18(6):717-719.
- Lauwers E, Debyser Z, Dorpe J, Strooper B, Nuttin B & Baekelandt V (2003) Neuropathology and Neurodegeneration in Rodent Brain Induced by Lentiviral Vectormediated Overexpression of α -Synuclein. *Brain pathology* 13(3):364-372.
- LaVoie MJ & Hastings TG (1999) Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine. *J. Neurosci.* 19(4):1484-1491.
- Lazarovici P, Cohen G, Arien-Zakay H, Chen J, Zhang C, Chopp M & Jiang H (2012) Multimodal neuroprotection induced by PACAP38 in oxygen-glucose deprivation and middle cerebral artery occlusion stroke models. *J. Mol. Neurosci.* 48(3):526-540.
- Lee A & Gilbert RM (2016) Epidemiology of Parkinson Disease. *Neurol. Clin.* 34(4):955-965.
- Lee CS, Kim YJ, Ko HH & Han ES (2007) Modulation of 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced mitochondrial dysfunction and cell death in PC12 cells by K(ATP) channel block. *J Neural Transm (Vienna)* 114(3):297-305.
- Lee EH & Seo SR (2014a) Neuroprotective roles of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in neurodegenerative diseases. *BMB Rep* 47(7):369-375.
- Lee J, Giordano S & Zhang J (2012) Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem. J.* 441(2):523-540.
- Lee MK, Stirling W, Xu Y, Xu X, Qui D, Mandir AS, Dawson TM, Copeland NG, Jenkins NA & Price DL (2002) Human α -synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 \rightarrow Thr mutation causes neurodegenerative disease with α -synuclein aggregation in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(13):8968-8973.
- Lee Y, Kang HC, Lee BD, Lee YI, Kim YP & Shin JH (2014b) Poly (ADP-ribose) in the pathogenesis of Parkinson's disease. *BMB Rep* 47(8):424-432.
- Lev N, Melamed E & Offen D (2003) Apoptosis and Parkinson's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27(2):245-250.
- Levy OA, Malagelada C & Greene LA (2009) Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis* 14(4):478-500.
- Li M, Maderdrut JL, Lertora JJ & Batuman V (2007a) Intravenous infusion of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in a patient with multiple myeloma and myeloma kidney: a case study. *Peptides* 28(9):1891-1895.
- Li X, Tan YC, Poulouse S, Olanow CW, Huang XY & Yue Z (2007b) Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)/PARK8 possesses GTPase activity that is altered in familial Parkinson's disease R1441C/G mutants. *Journal of neurochemistry* 103(1):238-247.
- Lim J, Lee Y, Jung S, Youdim MB & Oh YJ (2014) Impaired autophagic flux is critically involved in drug-induced dopaminergic neuronal death. *Parkinsonism & related disorders* 20 Suppl 1:S162-166.

- Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Le Bas JF, Broussolle E, Perret JE & Benabid AL (1995) Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet* 345(8942):91-95.
- Lin MT & Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443(7113):787-795.
- Linden A, Cardell LO, Yoshihara S & Nadel JA (1999) Bronchodilation by pituitary adenylate cyclase-activating peptide and related peptides. *Eur. Respir. J.* 14(2):443-451.
- Linden A, Yoshihara S, Chan B & Nadel JA (1995) Inhibition of bronchoconstriction by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP 1-27) in guinea-pigs in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 115(6):913-916.
- Liu X, Huang S, Wang X, Tang B, Li W & Mao Z (2015) Chaperone-mediated autophagy and neurodegeneration: connections, mechanisms, and therapeutic implications. *Neurosci. Bull.* 31(4):407-415.
- Lofrumento DD, Saponaro C, Cianciulli A, De Nuccio F, Mitolo V, Nicolardi G & Panaro MA (2011) MPTP-induced neuroinflammation increases the expression of pro-inflammatory cytokines and their receptors in mouse brain. *Neuroimmunomodulation* 18(2):79-88.
- Lopes FM, Schroder R, da Frota ML, Jr., Zanutto-Filho A, Muller CB, Pires AS, Meurer RT, Colpo GD, Gelain DP, Kapczinski F, Moreira JC, Fernandes Mda C & Klamt F (2010) Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Res.* 1337:85-94.
- Lugo-Huitron R, Ugalde Muniz P, Pineda B, Pedraza-Chaverri J, Rios C & Perez-de la Cruz V (2013) Quinolinic acid: an endogenous neurotoxin with multiple targets. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013:104024.
- Lutz EM, Ronaldson E, Shaw P, Johnson MS, Holland PJ & Mitchell R (2006) Characterization of novel splice variants of the PAC1 receptor in human neuroblastoma cells: consequences for signaling by VIP and PACAP. *Mol. Cell. Neurosci.* 31(2):193-209.
- Lynch-Day MA, Mao K, Wang K, Zhao M & Klionsky DJ (2012) The role of autophagy in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(4):a009357.
- Ma Y, Zhao S, Wang X, Shen S, Ma M, Xu W & Hong A (2015) A new recombinant PACAP-derived peptide efficiently promotes corneal wound repairing and lacrimal secretion. *Investigative ophthalmology & visual science* 56(8):4336-4349.
- Maasz G, Zrinyi Z, Reglodi D, Petrovics D, Rivnyak A, Kiss T, Jungling A, Tamas A & Pirger Z (2017) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) has a neuroprotective function in dopamine-based neurodegeneration in rat and snail parkinsonian models. *Dis. Model. Mech.* 10(2):127-139.
- MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM & Alnemri ES (1997) Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* 272(41):25417-25420.
- MacKenzie CJ, Lutz EM, Johnson MS, Robertson DN, Holland PJ & Mitchell R (2001) Mechanisms of phospholipase C activation by the vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 2 receptor. *Endocrinology* 142(3):1209-1217.
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A & Kroemer G (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(9):741-752.

- Mammucari C, Schiaffino S & Sandri M (2008) Downstream of Akt: FoxO3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle. *Autophagy* 4(4):524-526.
- Manavalan S, Getachew B, Manaye KF, Khundmiri SJ, Csoka AB, McKinley R, Tamas A, Reglodi D & Tizabi Y (2017) PACAP Protects Against Ethanol and Nicotine Toxicity in SH-SY5Y Cells: Implications for Drinking-Smoking Co-morbidity. *Neurotox. Res.* 10.1007/s12640-017-9727-8.
- Mansouri S, Agartz I, Ogren SO, Patrone C & Lundberg M (2017) PACAP Protects Adult Neural Stem Cells from the Neurotoxic Effect of Ketamine Associated with Decreased Apoptosis, ER Stress and mTOR Pathway Activation. *PLoS One* 12(1):e0170496.
- Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Kruger R, Rocca WA, Schneider NK, Lesnick TG, Lincoln SJ, Hulihan MM, Aasly JO, Ashizawa T, Chartier-Harlin MC, Checkoway H, Ferrarese C, Hadjigeorgiou G, Hattori N, Kawakami H, Lambert JC, Lynch T, Mellick GD, Papapetropoulos S, Parsian A, Quattrone A, Riess O, Tan EK & Van Broeckhoven C (2006) Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA* 296(6):661-670.
- Marazziti D, Di Pietro C, Golini E, Mandillo S, Matteoni R & Tocchini-Valentini GP (2009) Induction of macroautophagy by overexpression of the Parkinson's disease-associated GPR37 receptor. *FASEB J.* 23(6):1978-1987.
- Mariani E, Polidori MC, Cherubini A & Mecocci P (2005) Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 827(1):65-75.
- Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS & Herkenham MA (1984) Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature* 311(5985):464-467.
- Marsden CA (2006) Dopamine: the rewarding years. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl 1:S136-144.
- Marshall KA, Daniel SE, Cairns N, Jenner P & Halliwell B (1997) Upregulation of the anti-apoptotic protein Bcl-2 may be an early event in neurodegeneration: studies on Parkinson's and incidental Lewy body disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240(1):84-87.
- Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Brush J, Goddard A & Ashkenazi A (1998) Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. *Curr. Biol.* 8(9):525-528.
- Martignoni E, Blandini F, Godi L, Desideri S, Pacchetti C, Mancini F & Nappi G (1999) Peripheral markers of oxidative stress in Parkinson's disease. The role of L-DOPA. *Free Radic. Biol. Med.* 27(3-4):428-437.
- Martinez-Vicente M (2015) Autophagy in neurodegenerative diseases: From pathogenic dysfunction to therapeutic modulation. *Seminars in cell & developmental biology* 40:115-126.
- Martinez-Vicente M & Cuervo AM (2007) Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol.* 6(4):352-361.
- Martinez C, Delgado M, Gomariz RP & Ganea D (1996) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-38 inhibit IL-10 production in murine T lymphocytes. *J. Immunol.* 156(11):4128-4136.
- Masmoudi-Kouki O, Douiri S, Hamdi Y, Kaddour H, Bahdoudi S, Vaudry D, Basille M, Leprince J, Fournier A, Vaudry H, Tonon MC & Amri M (2011) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects astroglial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *J. Neurochem.* 117(3):403-411.

- Masmoudi O, Gandolfo P, Leprince J, Vaudry D, Fournier A, Patte-Mensah C, Vaudry H & Tonon MC (2003) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates endozepine release from cultured rat astrocytes via a PKA-dependent mechanism. *FASEB J.* 17(1):17-27.
- Masuo Y, Ohtaki T, Masuda Y, Tsuda M & Fujino M (1992) Binding sites for pituitary adenyloate cyclase activating polypeptide (PACAP): comparison with vasoactive intestinal polypeptide (VIP) binding site localization in rat brain sections. *Brain research* 575(1):113-123.
- Masuo Y, Suzuki N, Matsumoto H, Tokito F, Matsumoto Y, Tsuda M & Fujino M (1993) Regional distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat central nervous system as determined by sandwich-enzyme immunoassay. *Brain Res.* 602(1):57-63.
- Masuo Y, Tokito F, Matsumoto Y, Shimamoto N & Fujino M (1994) Ontogeny of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its binding sites in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 170(1):43-46.
- Mathieu M, Yon L, Charifou I, Trabucchi M, Vallarino M, Pinelli C, Fournier A, Rastogi RK & Vaudry H (2001) Ontogeny of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the frog (*Rana ridibunda*) tadpole brain: immunohistochemical localization and biochemical characterization. *J. Comp. Neurol.* 431(1):11-27.
- Matsuoka Y, Vila M, Lincoln S, McCormack A, Picciano M, LaFrancois J, Yu X, Dickson D, Langston WJ & McGowan E (2001) Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human α -synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter. *Neurobiology of disease* 8(3):535-539.
- Mauvezin C & Neufeld TP (2015) Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* 11(8):1437-1438.
- McCord JM (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* 108(8):652-659.
- McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA & Di Monte DA (2002) Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol. Dis.* 10(2):119-127.
- McIlwain DR, Berger T & Mak TW (2015) Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7(4).
- McRitchie DA, Hardman CD & Halliday GM (1996) Cytoarchitectural distribution of calcium binding proteins in midbrain dopaminergic regions of rats and humans. *J. Comp. Neurol.* 364(1):121-150.
- Meijer AJ & Codogno P (2004) Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36(12):2445-2462.
- Mentlein R (1999) Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul. Pept.* 85(1):9-24.
- Mercer A, Ronnholm H, Holmberg J, Lundh H, Heidrich J, Zachrisson O, Ossoinak A, Frisen J & Patrone C (2004) PACAP promotes neural stem cell proliferation in adult mouse brain. *J. Neurosci. Res.* 76(2):205-215.
- Michel PP, Hirsch EC & Hunot S (2016) Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron* 90(4):675-691.
- Miklossy J, Doudet DD, Schwab C, Yu S, McGeer EG & McGeer PL (2006) Role of ICAM-1 in persisting inflammation in Parkinson disease and MPTP monkeys. *Experimental neurology* 197(2):275-283.
- Miller GW (2007) Paraquat: the red herring of Parkinson's disease research. (Oxford University Press).

- Minkes RK, McMahon TJ, Higuera TR, Murphy WA, Coy DH & Kadowitz PJ (1992) Analysis of systemic and pulmonary vascular responses to PACAP and VIP: role of adrenal catecholamines. *Am. J. Physiol.* 263(6 Pt 2):H1659-1669.
- Miyashita T & Reed JC (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80(2):293-299.
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD & Coy DH (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164(1):567-574.
- Mizuno Y, Suzuki K & Sone N (1990) Inhibition of ATP synthesis by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) in mouse brain in vitro and in vivo. *Adv. Neurol.* 53:197-200.
- Mizushima H, Banks WA, Dohi K, Shioda S, Matsumoto H & Matsumoto K (1999) The effect of cardiac arrest on the permeability of the mouse blood-brain and blood-spinal cord barrier to pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Peptides* 20(11):1337-1340.
- Mizushima N (2007) Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 21(22):2861-2873.
- Mizushima N, Sugita H, Yoshimori T & Ohsumi Y (1998) A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* 273(51):33889-33892.
- Mochizuki H, Goto K, Mori H & Mizuno Y (1996) Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 137(2):120-123.
- Moehle MS, Webber PJ, Tse T, Sukar N, Standaert DG, DeSilva TM, Cowell RM & West AB (2012) LRRK2 inhibition attenuates microglial inflammatory responses. *J. Neurosci.* 32(5):1602-1611.
- Moehle MS & West AB (2015) M1 and M2 immune activation in Parkinson's Disease: Foe and ally? *Neuroscience* 302:59-73.
- Mogi M, Harada M, Kondo T, Mizuno Y, Narabayashi H, Riederer P & Nagatsu T (1996) bcl-2 protein is increased in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* 215(2):137-139.
- Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K & Nagatsu T (1994) Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* 165(1-2):208-210.
- Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H & Nagatsu T (1999) Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 270(1):45-48.
- Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H & Nagatsu T (2000) Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. *J Neural Transm (Vienna)* 107(3):335-341.
- Monti C, Bondi H, Urbani A, Fasano M & Alberio T (2015) Systems biology analysis of the proteomic alterations induced by MPP(+), a Parkinson's disease-related mitochondrial toxin. *Front. Cell. Neurosci.* 9:14.
- Moody TW, Ito T, Osefo N & Jensen RT (2011) VIP and PACAP: recent insights into their functions/roles in physiology and disease from molecular and genetic studies. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 18(1):61-67.

- Moors TE, Hoozemans JJ, Ingrassia A, Beccari T, Parnetti L, Chartier-Harlin MC & van de Berg WD (2017) Therapeutic potential of autophagy-enhancing agents in Parkinson's disease. *Mol. Neurodegener.* 12(1):11.
- Morais VA, Verstreken P, Roethig A, Smet J, Snellinx A, Vanbrabant M, Haddad D, Frezza C, Mandemakers W, Vogt-Weisenhorn D, Van Coster R, Wurst W, Scorrano L & De Strooper B (2009) Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function. *EMBO Mol. Med.* 1(2):99-111.
- More SV, Kumar H, Kim IS, Song SY & Choi DK (2013) Cellular and molecular mediators of neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mediators Inflamm.* 2013:952375.
- Morio H, Tatsuno I, Hirai A, Tamura Y & Saito Y (1996) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat-cultured cortical neurons from glutamate-induced cytotoxicity. *Brain Res* 741(1-2):82-88.
- Moro O & Lerner EA (1997) Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *Journal of Biological Chemistry* 272(2):966-970.
- Mosley RL, Benner EJ, Kadiu I, Thomas M, Boska MD, Hasan K, Laurie C & Gendelman HE (2006) Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Clin. Neurosci. Res.* 6(5):261-281.
- Mosley RL, Hutter-Saunders JA, Stone DK & Gendelman HE (2012) Inflammation and adaptive immunity in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2(1):a009381.
- Muftuoglu M, Elibol B, Dalmizrak O, Ercan A, Kulaksiz G, Ogun H, Dalkara T & Ozer N (2004) Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations. *Mov. Disord.* 19(5):544-548.
- Nachtman JP, Delor S & Brennan CE (1987) Manganese neurotoxicity: effects of varying oxygen tension and EDTA on dopamine auto-oxidation. *Neurotoxicology* 8(2):249-253.
- Nagatsu T (2002) Parkinson's disease: changes in apoptosis-related factors suggesting possible gene therapy. *J Neural Transm (Vienna)* 109(5-6):731-745.
- Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H & Togari A (2000a) Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* (60):277-290.
- Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H & Togari A (2000b) Cytokines in Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* (58):143-151.
- Nagatsu T & Sawada M (2007) Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects. *J. Neural Transm. Suppl.* (72):113-120.
- Nah J, Yuan J & Jung Y-K (2015a) Autophagy in neurodegenerative diseases: from mechanism to therapeutic approach. *Molecules and cells* 38(5):381.
- Nah J, Yuan J & Jung YK (2015b) Autophagy in neurodegenerative diseases: from mechanism to therapeutic approach. *Mol. Cells* 38(5):381-389.
- Nandha KA, Benito-Orfila MA, Smith DM, Ghatei MA & Bloom SR (1991) Action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide on the rat vascular system: effects on blood pressure and receptor binding. *J. Endocrinol.* 129(1):69-73.
- Narendra D, Tanaka A, Suen DF & Youle RJ (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* 183(5):795-803.

- Neuhoff H, Neu A, Liss B & Roeper J (2002) I(h) channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain. *J. Neurosci.* 22(4):1290-1302.
- Neumann H & Wekerle H (1998) Neuronal control of the immune response in the central nervous system: linking brain immunity to neurodegeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57(1):1-9.
- Neumann JM, Couvineau A, Murail S, Lacapere JJ, Jamin N & Laburthe M (2008) Class-B GPCR activation: is ligand helix-capping the key? *Trends Biochem. Sci.* 33(7):314-319.
- Nicholls DG (2004) Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. *Curr. Mol. Med.* 4(2):149-177.
- Nishimoto M, Furuta A, Aoki S, Kudo Y, Miyakawa H & Wada K (2007) PACAP/PAC1 autocrine system promotes proliferation and astrogenesis in neural progenitor cells. *Glia* 55(3):317-327.
- Niu XY, Huang HJ, Zhang JB, Zhang C, Chen WG, Sun CY, Ding YQ & Liao M (2016) Deletion of autophagy-related gene 7 in dopaminergic neurons prevents their loss induced by MPTP. *Neuroscience* 339:22-31.
- Nixon RA (2007) Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J. Cell Sci.* 120(Pt 23):4081-4091.
- Nonaka N, Banks WA, Mizushima H, Shioda S & Morley JE (2002) Regional differences in PACAP transport across the blood-brain barrier in mice: a possible influence of strain, amyloid beta protein, and age. *Peptides* 23(12):2197-2202.
- Nonaka N, Shioda S & Banks WA (2005) Effect of lipopolysaccharide on the transport of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide across the blood-brain barrier. *Experimental neurology* 191(1):137-144.
- Nopparat C, Porter JE, Ebadi M & Govitrapong P (2014a) 1-Methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death via autophagy through a Bcl-2/Beclin 1 complex-dependent pathway. *Neurochemical research* 39(2):225-232.
- Nopparat C, Porter JE, Ebadi M & Govitrapong P (2014b) 1-Methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death via autophagy through a Bcl-2/Beclin 1 complex-dependent pathway. *Neurochem. Res.* 39(2):225-232.
- Obata T, Kinemuchi H & Aomine M (2002) Protective effect of diltiazem, a L-type calcium channel antagonist, on bisphenol A-enhanced hydroxyl radical generation by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion in rat striatum. *Neurosci. Lett.* 334(3):211-213.
- Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y & Taya Y (2000) p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 102(6):849-862.
- Ohtaki H, Dohi K, Yofu S, Nakamachi T, Kudo Y, Endo S, Aruga T, Goto N, Watanabe J, Kikuyama S & Shioda S (2004) Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38 (PACAP38) on tissue oxygen content--treatment in central nervous system of mice. *Regul. Pept.* 123(1-3):61-67.
- Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Aizawa Y, Takaki A, Hodoyama K, Yofu S, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Kopf M, Iwakura Y, Matsuda K, Arimura A & Shioda S (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(19):7488-7493.
- Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K & Shioda S (2008) Role of PACAP in ischemic neural death. *J. Mol. Neurosci.* 36(1-3):16-25.

- Ojha RP, Rastogi M, Devi BP, Agrawal A & Dubey GP (2012) Neuroprotective effect of curcuminoids against inflammation-mediated dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 7(3):609-618.
- Oka H, Mochio S, Sato H & Katayama K (1997) Prolongation of QTc interval in patients with Parkinson's disease. *Eur. Neurol.* 37(3):186-189.
- Oliveras-Salvá M, Van der Perren A, Casadei N, Stroobants S, Nuber S, D'Hooge R, Van den Haute C & Baekelandt V (2013) rAAV2/7 vector-mediated overexpression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra induces protein aggregation and progressive dose-dependent neurodegeneration. *Molecular neurodegeneration* 8(1):44.
- Olmos G & Llado J (2014) Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm.* 2014:861231.
- Olney JW (1990) Excitotoxicity: an overview. *Can. Dis. Wkly. Rep.* 16 Suppl 1E:47-57; discussion 57-48.
- Olson JK & Miller SD (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J. Immunol.* 173(6):3916-3924.
- Onoue S, Endo K, Ohshima K, Yajima T & Kashimoto K (2002a) The neuropeptide PACAP attenuates beta-amyloid (1-42)-induced toxicity in PC12 cells. *Peptides* 23(8):1471-1478.
- Onoue S, Endo K, Ohshima K, Yajima T & Kashimoto K (2002b) The neuropeptide PACAP attenuates β -amyloid (1-42)-induced toxicity in PC12 cells. *Peptides* 23(8):1471-1478.
- Orihuela R, McPherson CA & Harry GJ (2016) Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br. J. Pharmacol.* 173(4):649-665.
- Orii KE, Aoyama T, Souri M, Jiang LL, Orii KO, Hayashi S, Yamaguchi S, Kondo N, Orii T & Hashimoto T (1996) Formation of the enzyme complex in mitochondria is required for function of trifunctional beta-oxidation protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219(3):773-777.
- Orr CF, Rowe DB & Halliday GM (2002) An inflammatory review of Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 68(5):325-340.
- Pabon MM, Bachstetter AD, Hudson CE, Gemma C & Bickford PC (2011) CX3CL1 reduces neurotoxicity and microglial activation in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neuroinflammation* 8:9.
- Packer MA, Miesel R & Murphy MP (1996) Exposure to the parkinsonian neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) and nitric oxide simultaneously causes cyclosporin A-sensitive mitochondrial calcium efflux and depolarisation. *Biochem. Pharmacol.* 51(3):267-273.
- Paintlia AS, Paintlia MK, Singh I, Skoff RB & Singh AK (2009) Combination therapy of lovastatin and rolipram provides neuroprotection and promotes neurorepair in inflammatory demyelination model of multiple sclerosis. *Glia* 57(2):182-193.
- Palkovits M, Somogyvari-Vigh A & Arimura A (1995) Concentrations of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in human brain nuclei. *Brain Res.* 699(1):116-120.
- Pan J, Zhao YX, Wang ZQ, Jin L, Sun ZK & Chen SD (2007) Expression of FasL and its interaction with Fas are mediated by c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway in 6-OHDA-induced rat model of Parkinson disease. *Neurosci. Lett.* 428(2-3):82-87.
- Pan T, Rawal P, Wu Y, Xie W, Jankovic J & Le W (2009) Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction. *Neuroscience* 164(2):541-551.

- Pan W, Banks WA & Kastin AJ (1997) Blood-brain barrier permeability to ebratide and TNF in acute spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 146(2):367-373.
- Pan W & Kastin AJ (2001) Increase in TNF α transport after SCI is specific for time, region, and type of lesion. *Exp. Neurol.* 170(2):357-363.
- Pan W, Zhang L, Liao J, Csernus B & Kastin AJ (2003) Selective increase in TNF α permeation across the blood-spinal cord barrier after SCI. *J. Neuroimmunol.* 134(1-2):111-117.
- Parker WD, Jr., Boyson SJ & Parks JK (1989) Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 26(6):719-723.
- Parker WD, Jr. & Swerdlow RH (1998) Mitochondrial dysfunction in idiopathic Parkinson disease. *American journal of human genetics* 62(4):758-762.
- Pathak A & Senard JM (2006) Blood pressure disorders during Parkinson's disease: epidemiology, pathophysiology and management. *Expert Rev. Neurother.* 6(8):1173-1180.
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD & Levine B (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122(6):927-939.
- Pearce JM (1989) Aspects of the history of Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* Suppl:6-10.
- Perier C, Bove J & Vila M (2012) Mitochondria and programmed cell death in Parkinson's disease: apoptosis and beyond. *Antioxidants & redox signaling* 16(9):883-895.
- Perry G, Cash AD & Smith MA (2002) Alzheimer Disease and Oxidative Stress. *J. Biomed. Biotechnol.* 2(3):120-123.
- Pham-Huy LA, He H & Pham-Huy C (2008) Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 4(2):89-96.
- Phelouzat M-A, Laforge T, Arbogast A, Quadri RA, Boutet S & Proust JJ (1997) Susceptibility to apoptosis of T lymphocytes from elderly humans is associated with increased in vivo expression of functional Fas receptors. *Mechanisms of ageing and development* 96(1-3):35-46.
- Pickrell AM & Youle RJ (2015) The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron* 85(2):257-273.
- Piggins HD, Stamp JA, Burns J, Rusak B & Semba K (1996) Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) immunoreactivity in the hypothalamus and extended amygdala of the rat. *J. Comp. Neurol.* 376(2):278-294.
- Pisanu A, Lecca D, Mulas G, Wardas J, Simbula G, Spiga S & Carta AR (2014) Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR- γ agonist neuroprotective treatment in the MPTPp mouse model of progressive Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 71:280-291.
- Pletscher A (1957) [Effect of isopropyl-isonicotinic acid hydrazide on the metabolism of catechol amines and 5-hydroxytryptamine in the brain]. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 87(50):1532-1534.
- Poewe W (2008) Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur. J. Neurol.* 15 Suppl 1:14-20.
- Polito L, Greco A & Seripa D (2016) Genetic Profile, Environmental Exposure, and Their Interaction in Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis.* 2016:6465793.

- Poujol de Molliens M, Létourneau M, Devost D, Hébert T.E, Fournier A, Chatenet A (2018) New insights into the peculiar role in PACAP signaling and neuroprotection of the 28-38 C-terminal segment and some selected residues. *Biochem. Pharmacol.*
- Poyner DR & Hay DL (2012) Secretin family (Class B) G protein-coupled receptors - from molecular to clinical perspectives. *Br. J. Pharmacol.* 166(1):1-3.
- Prasad K, Winnik B, Thiruchelvam MJ, Buckley B, Mirochnitchenko O & Richfield EK (2007) Prolonged toxicokinetics and toxicodynamics of paraquat in mouse brain. *Environ. Health Perspect.* 115(10):1448-1453.
- Presgraves SP, Ahmed T, Borwege S & Joyce JN (2004) Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotox. Res.* 5(8):579-598.
- Price DL, Rockenstein E, Ubhi K, Phung V, MacLean-Lewis N, Askay D, Cartier A, Spencer B, Patrick C, Desplats P, Ellisman MH & Masliah E (2010) Alterations in mGluR5 expression and signaling in Lewy body disease and in transgenic models of alpha-synucleinopathy--implications for excitotoxicity. *PLoS One* 5(11):e14020.
- Przedborski S (2010) Inflammation and Parkinson's disease pathogenesis. *Mov. Disord.* 25 Suppl 1:S55-57.
- Pugh PC & Margiotta JF (2006) PACAP support of neuronal survival requires MAPK- and activity-generated signals. *Mol. Cell. Neurosci.* 31(3):586-595.
- Puyal J, Ginet V, Grishchuk Y, Truttmann AC & Clarke PG (2012) Neuronal autophagy as a mediator of life and death: contrasting roles in chronic neurodegenerative and acute neural disorders. *Neuroscientist* 18(3):224-236.
- Racz B, Gallyas F, Jr., Kiss P, Toth G, Hegyi O, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Roth E, Tamas A, Lengvari I, Lubics A & Reglodi D (2006) The neuroprotective effects of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion involve inhibition of proapoptotic signaling pathways. *Regul. Pept.* 137(1-2):20-26.
- Racz B, Horvath G, Reglodi D, Gasz B, Kiss P, Gallyas F, Jr., Sumegi B, Toth G, Nemeth A, Lubics A & Tamas A (2010) PACAP ameliorates oxidative stress in the chicken inner ear: an in vitro study. *Regul. Pept.* 160(1-3):91-98.
- Radi E, Formichi P, Battisti C & Federico A (2014) Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *J. Alzheimers Dis.* 42 Suppl 3:S125-152.
- Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S & Dhama K (2014) Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int* 2014:761264.
- Ramos-Alvarez I, Mantey SA, Nakamura T, Nuche-Berenguer B, Moreno P, Moody TW, Maderdrut JL, Coy DH & Jensen RT (2015) A structure-function study of PACAP using conformationally restricted analogs: Identification of PAC1 receptor-selective PACAP agonists. *Peptides* 66:26-42.
- Rappold PM & Tieu K (2010) Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. *Neurotherapeutics* 7(4):413-423.
- Rat D, Schmitt U, Tippmann F, Dewachter I, Theunis C, Wiczerzak E, Postina R, van Leuven F, Fahrenholz F & Kojro E (2011) Neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) slows down Alzheimer's disease-like pathology in amyloid precursor protein-transgenic mice. *FASEB J.* 25(9):3208-3218.

- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR & Rubinsztein DC (2010) Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 90(4):1383-1435.
- Ravni A, Bourgault S, Lebon A, Chan P, Galas L, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez B, Eiden LE & Vaudry D (2006) The neurotrophic effects of PACAP in PC12 cells: control by multiple transduction pathways. *Journal of neurochemistry* 98(2):321-329.
- Reglodi D, Fabian Z, Tamas A, Lubics A, Szeberenyi J, Alexy T, Toth K, Marton Z, Borsiczky B, Roth E, Szalontay L & Lengvari I (2004a) Effects of PACAP on in vitro and in vivo neuronal cell death, platelet aggregation, and production of reactive oxygen radicals. *Regulatory peptides* 123(1-3):51-59.
- Reglodi D, Kiss P, Lubics A & Tamas A (2011) Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo. *Curr. Pharm. Des.* 17(10):962-972.
- Reglodi D, Lubics A, Kiss P, Lengvari I, Gaszner B, Toth G, Hegyi O & Tamas A (2006a) Effect of PACAP in 6-OHDA-induced injury of the substantia nigra in intact young and ovariectomized female rats. *Neuropeptides* 40(4):265-274.
- Reglodi D, Lubics A, Tamas A, Szalontay L & Lengvari I (2004b) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects dopaminergic neurons and improves behavioral deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Behavioural brain research* 151(1-2):303-312.
- Reglodi D, Somogyvari-Vigh A, Vigh S, Maderdrut JL & Arimura A (2000) Neuroprotective effects of PACAP38 in a rat model of transient focal ischemia under various experimental conditions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 921:119-128.
- Reglodi D, Tamas A, Lengvari I, Toth G, Szalontay L & Lubics A (2006b) Comparative study of the effects of PACAP in young, aging, and castrated males in a rat model of Parkinson's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1070:518-524.
- Reglodi D, Tamas A, Lubics A, Szalontay L & Lengvari I (2004c) Morphological and functional effects of PACAP in 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Regul. Pept.* 123(1-3):85-94.
- Reglodi D, Tamas A, Somogyvari-Vigh A, Szanto Z, Kertes E, Lenard L, Arimura A & Lengvari I (2002) Effects of pretreatment with PACAP on the infarct size and functional outcome in rat permanent focal cerebral ischemia. *Peptides* 23(12):2227-2234.
- Rego AC & Oliveira CR (2003) Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem. Res.* 28(10):1563-1574.
- Riederer P & Laux G (2011) MAO-inhibitors in Parkinson's Disease. *Exp. Neurobiol.* 20(1):1-17.
- Robberecht P, Gourlet P, De Neef P, Woussen-Colle MC, Vandermeers-Piret MC, Vandermeers A & Christophe J (1992) Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylate-cyclase-activating-peptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. Discovery of PACAP(6-38) as a potent antagonist. *Eur J Biochem* 207(1):239-246.

- Rodriguez-Blanco J, Martin V, Garcia-Santos G, Herrera F, Casado-Zapico S, Antolin I & Rodriguez C (2012) Cooperative action of JNK and AKT/mTOR in 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced autophagy of neuronal PC12 cells. *Journal of neuroscience research* 90(9):1850-1860.
- Rodriguez-Navarro JA, Casarejos MJ, Menendez J, Solano RM, Rodal I, Gomez A, Yebenes JG & Mena MA (2007) Mortality, oxidative stress and tau accumulation during ageing in parkin null mice. *J. Neurochem.* 103(1):98-114.
- Romo-Gutierrez D, Yescas P, Lopez-Lopez M & Boll MC (2015) [Genetic factors associated with dementia in Parkinson's disease (PD)]. *Gac. Med. Mex.* 151(1):110-118.
- Ruberg M, France-Lanord V, Brugg B, Lambeng N, Michel PP, Anglade P, Hunot S, Damier P, Faucheux B, Hirsch E & Agid Y (1997a) [Neuronal death caused by apoptosis in Parkinson disease]. *Rev Neurol (Paris)* 153(8-9):499-508.
- Ruberg M, France-Lanord V, Lambeng N, Nguyen TT, Cerqueira E, Brugg B, Michel PP, Hunot S, Faucheux B, Hirsch E & Agid Y (1997b) Hypothetical mechanisms of neurodegeneration in Parkinson's disease. *J Neurochem* 69:S140-S140.
- Ryan BJ, Hoek S, Fon EA & Wade-Martins R (2015) Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends Biochem. Sci.* 40(4):200-210.
- Saguchi Y, Ando T, Watanabe T, Yamaki K, Suzuki R & Takagi K (1997) Inhibitory effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on histamine-induced respiratory resistance in anesthetized guinea pigs. *Regul. Pept.* 70(1):9-13.
- Said SI, Dickman K, Dey RD, Bandyopadhyay A, De Stefanis P, Raza S, Pakbaz H & Berisha HI (1998) Glutamate toxicity in the lung and neuronal cells: prevention or attenuation by VIP and PACAP. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 865:226-237.
- Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, Gage FH & Glass CK (2009) A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* 137(1):47-59.
- Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L & Sabatini DM (2008) The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320(5882):1496-1501.
- Sanchez-Ferro A, Benito-Leon J & Gomez-Esteban JC (2013) The management of orthostatic hypotension in Parkinson's disease. *Frontiers in neurology* 4:64.
- Sanchez-Guajardo V, Barnum CJ, Tansey MG & Romero-Ramos M (2013) Neuroimmunological processes in Parkinson's disease and their relation to alpha-synuclein: microglia as the referee between neuronal processes and peripheral immunity. *ASN Neuro* 5(2):113-139.
- Sano I, Gamo T, Kakimoto Y, Taniguchi K, Takesada M & Nishinuma K (1959) Distribution of catechol compounds in human brain. *Biochim. Biophys. Acta* 32:586-587.
- Sarkar S (2013) Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochem. Soc. Trans.* 41(5):1103-1130.
- Sarkar S, Raymick J & Imam S (2016) Neuroprotective and Therapeutic Strategies against Parkinson's Disease: Recent Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 17(6).

- Sato K, Tsuchihara K, Fujii S, Sugiyama M, Goya T, Atomi Y, Ueno T, Ochiai A & Esumi H (2007) Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. *Cancer Res.* 67(20):9677-9684.
- Sattler R & Tymianski M (2001) Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol. Neurobiol.* 24(1-3):107-129.
- Sauer H & Oertel W (1994) Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59(2):401-415.
- Sawangjaroen K & Curlewis JD (1994) Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on prolactin, luteinizing hormone and growth hormone secretion in the ewe. *J. Neuroendocrinol.* 6(5):549-555.
- Sawangjaroen K, Dallemagne CR, Cross RB & Curlewis JD (1992) Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on the cardiovascular system in sheep. *Peptides* 13(5):1029-1032.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P & Marsden CD (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 54(3):823-827.
- Schapira AH, Olanow CW, Greenamyre JT & Bezdard E (2014) Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. *Lancet* 384(9942):545-555.
- Seaborn T, Masmoudi-Kouli O, Fournier A, Vaudry H & Vaudry D (2011a) Protective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) against apoptosis. *Current pharmaceutical design* 17(3):204-214.
- Seaborn T, Masmoudi-Kouli O, Fournier A, Vaudry H & Vaudry D (2011b) Protective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) against apoptosis. *Current pharmaceutical design* 17(3):204-214.
- Seaton TA, Cooper JM & Schapira AH (1997) Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors. *Brain research* 777(1):110-118.
- Seidl SE & Potashkin JA (2011) The promise of neuroprotective agents in Parkinson's disease. *Front. Neurol.* 2:68.
- Seidler A, Hellenbrand W, Robra BP, Vieregge P, Nischan P, Joerg J, Oertel WH, Ulm G & Schneider E (1996) Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany. *Neurology* 46(5):1275-1284.
- Shamas-Din A, Kale J, Leber B & Andrews DW (2013) Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5(4):a008714.
- Shang L & Wang X (2011) AMPK and mTOR coordinate the regulation of Ulk1 and mammalian autophagy initiation. *Autophagy* 7(8):924-926.
- Shanks J & Herring N (2013) Peripheral cardiac sympathetic hyperactivity in cardiovascular disease: role of neuropeptides. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 305(12):R1411-R1420.
- Shao ZQ & Liu ZJ (2015) Neuroinflammation and neuronal autophagic death were suppressed via Rosiglitazone treatment: New evidence on neuroprotection in a rat model of global cerebral ischemia. *J. Neurol. Sci.* 349(1-2):65-71.

- Sharma N & Nehru B (2015) Characterization of the lipopolysaccharide induced model of Parkinson's disease: Role of oxidative stress and neuroinflammation. *Neurochem. Int.* 87:92-105.
- Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A & Greenamyre JT (2003) Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 23(34):10756-10764.
- Shi J, Liu X, Xu C, Ge J, Ren J, Wang J, Song X, Dai S, Tao W & Lu H (2015) Up-regulation of PSMB4 is associated with neuronal apoptosis after neuroinflammation induced by lipopolysaccharide. *J. Mol. Histol.* 46(6):457-466.
- Shi R, Weng J, Zhao L, Li XM, Gao TM & Kong J (2012) Excessive autophagy contributes to neuron death in cerebral ischemia. *CNS Neurosci. Ther.* 18(3):250-260.
- Shintani N, Suetake S, Hashimoto H, Koga K, Kasai A, Kawaguchi C, Morita Y, Hirose M, Sakai Y, Tomimoto S, Matsuda T & Baba A (2005) Neuroprotective action of endogenous PACAP in cultured rat cortical neurons. *Regul. Pept.* 126(1-2):123-128.
- Shioda S (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptors in the brain. *Kaibogaku Zasshi* 75(6):487-507.
- Shioda S & Nakamachi T (2015) PACAP as a neuroprotective factor in ischemic neuronal injuries. *Peptides* 72:202-207.
- Shioda S, Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Watanabe J, Nakajo S, Arata S, Kitamura S, Okuda H, Takenoya F & Kitamura Y (2006) Pleiotropic functions of PACAP in the CNS: neuroprotection and neurodevelopment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1070:550-560.
- Shivers KY, Nikolopoulou A, Machlovi SI, Vallabhajosula S & Figueiredo-Pereira ME (2014) PACAP27 prevents Parkinson-like neuronal loss and motor deficits but not microglia activation induced by prostaglandin J2. *Biochim. Biophys. Acta* 1842(9):1707-1719.
- Shoge K, Mishima HK, Saitoh T, Ishihara K, Tamura Y, Shiomi H & Sasa M (1999) Attenuation by PACAP of glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Brain Res.* 839(1):66-73.
- Sies H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82(2):291-295.
- Sil S, Ghosh A & Ghosh T (2016) Impairment of blood brain barrier is related with the neuroinflammation induced peripheral immune status in intracerebroventricular colchicine injected rats: An experimental study with mannitol. *Brain Res.* 1646:278-286.
- Singer TP, Ramsay RR, McKeown K, Trevor A & Castagnoli NE, Jr. (1988) Mechanism of the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+), the toxic bioactivation product of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Toxicology* 49(1):17-23.
- Soliman GA (2005) The mammalian target of rapamycin signaling network and gene regulation. *Curr. Opin. Lipidol.* 16(3):317-323.
- Somogyvari-Vigh A, Pan W, Reglodi D, Kastin AJ & Arimura A (2000) Effect of middle cerebral artery occlusion on the passage of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide across the blood-brain barrier in the rat. *Regul. Pept.* 91(1-3):89-95.
- Somogyvari-Vigh A & Reglodi D (2004) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. *Curr. Pharm. Des.* 10(23):2861-2889.
- Sosa V, Moline T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H & ME LL (2013) Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev* 12(1):376-390.

- Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH & Journot L (1993) Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365(6442):170-175.
- Stefanis L, Larsen KE, Rideout HJ, Sulzer D & Greene LA (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.* 21(24):9549-9560.
- Su LY, Li H, Lv L, Feng YM, Li GD, Luo R, Zhou HJ, Lei XG, Ma L, Li JL, Xu L, Hu XT & Yao YG (2015) Melatonin attenuates MPTP-induced neurotoxicity via preventing CDK5-mediated autophagy and SNCA/alpha-synuclein aggregation. *Autophagy* 11(10):1745-1759.
- Su YC & Qi X (2013) Inhibition of excessive mitochondrial fission reduced aberrant autophagy and neuronal damage caused by LRRK2 G2019S mutation. *Human molecular genetics* 22(22):4545-4561.
- Suk K, Park JH & Lee WH (2004) Neuropeptide PACAP inhibits hypoxic activation of brain microglia: a protective mechanism against microglial neurotoxicity in ischemia. *Brain Res.* 1026(1):151-156.
- Swanson MS (2006) Autophagy: eating for good health. *J. Immunol.* 177(8):4945-4951.
- Sy HN, Wu SL, Wang WF, Chen CH, Huang YT, Liou YM, Chiou CS, Pawlak CR & Ho YJ (2010) MPTP-induced dopaminergic degeneration and deficits in object recognition in rats are accompanied by neuroinflammation in the hippocampus. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 95(2):158-165.
- Syntichaki P, Xu K, Driscoll M & Tavernarakis N (2002) Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Nature* 419(6910):939-944.
- Sze KH, Zhou H, Yang Y, He M, Jiang Y & Wong AO (2007) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a growth hormone (GH)-releasing factor in grass carp: II. Solution structure of a brain-specific PACAP by nuclear magnetic resonance spectroscopy and functional studies on GH release and gene expression. *Endocrinology* 148(10):5042-5059.
- Tait SW & Green DR (2010) Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11(9):621-632.
- Takahashi R, Kawamata J & Takeuchi H (2009) [Pathogenesis of sporadic Parkinson's disease: contribution of genetic and environmental risk factors]. *Rinsho Shinkeigaku.* 49(11):885-887.
- Takei N, Skoglosa Y & Lindholm D (1998) Neurotrophic and neuroprotective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on mesencephalic dopaminergic neurons. *J. Neurosci. Res.* 54(5):698-706.
- Tamas A, Lubics A, Lengvari I & Reglodi D (2006a) Protective effects of PACAP in excitotoxic striatal lesion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1070:570-574.
- Tamas A, Lubics A, Lengvari I & Reglodi D (2006b) Protective effects of PACAP in excitotoxic striatal lesion. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1070(1):570-574.
- Tamas A, Reglodi D, Farkas O, Kovcsdi E, Pal J, Povlishock JT, Schwarcz A, Czeiter E, Szanto Z, Doczi T, Buki A & Bukovics P (2012) Effect of PACAP in central and peripheral nerve injuries. *Int. J. Mol. Sci.* 13(7):8430-8448.
- Tamas A, Zsombok A, Farkas O, Reglodi D, Pal J, Buki A, Lengvari I, Povlishock JT & Doczi T (2006c) Postinjury administration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) attenuates traumatically induced axonal injury in rats. *J. Neurotrauma* 23(5):686-695.

- Tams JW, Johnsen AH & Fahrenkrug J (1999) Identification of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide1-38-binding factor in human plasma, as ceruloplasmin. *Biochem. J.* 341 (Pt 2):271-276.
- Tang H, Sun L, Xin Z & Ganea D (1996) Down-regulation of cytokine expression in murine lymphocytes by PACAP and VIP. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 805:768-778.
- Tang Y, Li T, Li J, Yang J, Liu H, Zhang XJ & Le W (2014) Jmjd3 is essential for the epigenetic modulation of microglia phenotypes in the immune pathogenesis of Parkinson's disease. *Cell Death Differ.* 21(3):369-380.
- Tanida I, Ueno T & Kominami E (2004) LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36(12):2503-2518.
- Tansey MG & Goldberg MS (2010) Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol. Dis.* 37(3):510-518.
- Tartaglia LA, Rothe M, Hu YF & Goeddel DV (1993) Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 73(2):213-216.
- Tatsuno I, Gottschall PE, Köves K & Arimura A (1990) Demonstration of specific binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in rat astrocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 168(3):1027-1033.
- Taylor DL, Jones F, Kubota ES & Pocock JM (2005) Stimulation of microglial metabotropic glutamate receptor mGlu2 triggers tumor necrosis factor alpha-induced neurotoxicity in concert with microglial-derived Fas ligand. *J. Neurosci.* 25(11):2952-2964.
- Thomas C, Mackey MM, Diaz AA & Cox DP (2009) Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation. *Redox Rep* 14(3):102-108.
- Tintner R & Jankovic J (2003) Dopamine agonists in Parkinson's disease. *Expert Opin Investig Drugs* 12(11):1803-1820.
- Tong J, Ang LC, Williams B, Furukawa Y, Fitzmaurice P, Guttman M, Boileau I, Hornykiewicz O & Kish SJ (2015) Low levels of astroglial markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein accumulation. *Neurobiol. Dis.* 82:243-253.
- Tooze SA (2013) Current views on the source of the autophagosomal membrane. *Essays Biochem.* 55:29-38.
- Tooze SA & Yoshimori T (2010) The origin of the autophagosomal membrane. *Nat. Cell Biol.* 12(9):831-835.
- Touyz RM (2004) Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37(8):1263-1273.
- Tramutola A, Lanzillotta C, Perluigi M & Butterfield DA (2016) Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain Res. Bull.* 10.1016/j.brainresbull.2016.06.005.
- Tranchant C, Weess C & Warter JM (1995) [Idiopathic Parkinson disease and mitochondrial functions]. *Rev Neurol (Paris)* 151(3):157-160.
- Tsutsumi M, Claus TH, Liang Y, Li Y, Yang L, Zhu J, Dela Cruz F, Peng X, Chen H, Yung SL, Hamren S, Livingston JN & Pan CQ (2002) A potent and highly selective VPAC2 agonist enhances glucose-induced insulin release and glucose disposal: a potential therapy for type 2 diabetes. *Diabetes* 51(5):1453-1460.

- Turmel H, Hartmann A, Parain K, Douhou A, Srinivasan A, Agid Y & Hirsch EC (2001) Caspase-3 activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice. *Mov. Disord.* 16(2):185-189.
- Tzeng YW, Lee LY, Chao PL, Lee HC, Wu RT & Lin AM (2010) Role of autophagy in protection afforded by hypoxic preconditioning against MPP⁺-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *Free Radic. Biol. Med.* 49(5):839-846.
- Uchida D, Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Shioda S & Banks WA (1996) Prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Brain Res.* 736(1-2):280-286.
- Uversky VN, Li J & Fink AL (2001) Pesticides directly accelerate the rate of α -synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease. *FEBS letters* 500(3):105-108.
- Valadas JS, Vos M & Verstreken P (2015) Therapeutic strategies in Parkinson's disease: what we have learned from animal models. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1338:16-37.
- Valente EM, Salvi S, Ialongo T, Marongiu R, Elia AE, Caputo V, Romito L, Albanese A, Dallapiccola B & Bentivoglio AR (2004) PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann. Neurol.* 56(3):336-341.
- Valiante S, Prisco M, De Falco M, Sellitti A, Zambrano I, Sciarrillo R, Capaldo A, Gay F, Andreuccetti P & Laforgia V (2009) Distribution and molecular evolution of the neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptors in the lizard *Podarcis sicula* (Squamata, Lacertidae). *J. Mol. Neurosci.* 39(1-2):144-156.
- Vandermeers A, Vandenborre S, Hou X, de Neef P, Robberecht P, Vandermeers-Piret MC & Christophe J (1992) Antagonistic properties are shifted back to agonistic properties by further N-terminal shortening of pituitary adenylate-cyclase-activating peptides in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. *Eur. J. Biochem.* 208(3):815-819.
- Varga B, Szabadfi K, Kiss P, Fabian E, Tamas A, Griecs M, Gabriel R, Reglodi D, Kemeny-Beke A, Pamer Z, Biro Z, Tosaki A, Atlasz T & Juhasz B (2011) PACAP improves functional outcome in excitotoxic retinal lesion: an electroretinographic study. *J Mol Neurosci* 43(1):44-50.
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Basille M, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H & Gonzalez BJ (2003) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents C2-ceramide-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* 72(3):303-316.
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L & Vaudry H (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol. Rev.* 61(3):283-357.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A & Vaudry H (2000a) The neuroprotective effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cerebellar granule cells is mediated through inhibition of the CED3-related cysteine protease caspase-3/ CPP32. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(24):13390-13395.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A & Vaudry H (2000b) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* 52(2):269-324.

- Vaudry D, Pamantung TF, Basille M, Rousselle C, Fournier A, Vaudry H, Beauvillain JC & Gonzalez BJ (2002a) PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur. J. Neurosci.* 15(9):1451-1460.
- Vaudry D, Rousselle C, Basille M, Falluel-Morel A, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H & Gonzalez BJ (2002b) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(9):6398-6403.
- Venderova K & Park DS (2012) Programmed cell death in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(8).
- Verhagen Metman L, Del Dotto P, van den Munckhof P, Fang J, Mouradian MM & Chase TN (1998) Amantadine as treatment for dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. *Neurology* 50(5):1323-1326.
- Villalba M, Bockaert J & Journot L (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway. *J. Neurosci.* 17(1):83-90.
- Viollet B & Andreelli F (2011) AMP-activated protein kinase and metabolic control. *Handb. Exp. Pharmacol.* 10.1007/978-3-642-17214-4_13(203):303-330.
- Viviani B, Boraso M, Marchetti N & Marinovich M (2014) Perspectives on neuroinflammation and excitotoxicity: a neurotoxic conspiracy? *Neurotoxicology* 43:10-20.
- Voges J, Volkman J, Allert N, Lehrke R, Koulousakis A, Freund HJ & Sturm V (2002) Bilateral high-frequency stimulation in the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson disease: correlation of therapeutic effect with anatomical electrode position. *J. Neurosurg.* 96(2):269-279.
- Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K & Stefanis L (2008) Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 283(35):23542-23556.
- Voss P & Siems W (2006) Clinical oxidation parameters of aging. *Free Radic. Res.* 40(12):1339-1349.
- Wachter B, Schurger S, Rolinger J, von Ameln-Mayerhofer A, Berg D, Wagner HJ & Kueppers E (2010) Effect of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on proliferation of glial cells in the rat cortex and striatum: evidence for de-differentiation of resident astrocytes. *Cell Tissue Res.* 342(2):147-160.
- Wagner GC, Seiden LS & Schuster CR (1979) Methamphetamine-induced changes in brain catecholamines in rats and guinea pigs. *Drug & Alcohol Dependence* 4(5):435-438.
- Walter C, Clemens LE, Muller AJ, Fallier-Becker P, Proikas-Cezanne T, Riess O, Metzger S & Nguyen HP (2016) Activation of AMPK-induced autophagy ameliorates Huntington disease pathology in vitro. *Neuropharmacology* 108:24-38.
- Wang B, Abraham N, Gao G & Yang Q (2016a) Dysregulation of autophagy and mitochondrial function in Parkinson's disease. *Transl Neurodegener* 5:19.
- Wang C, Ma H, Feng X, Xie S & Chan P (2010) Parkin dosage mutations in patients with early-onset sporadic and familial Parkinson's disease in Chinese: an independent pathogenic role. *Brain Res.* 1358:30-38.
- Wang EC, Kitson J, Thern A, Williamson J, Farrow SN & Owen MJ (2001) Genomic structure, expression, and chromosome mapping of the mouse homologue for the WSL-1 (DR3, Apo3, TRAMP, LARD, TR3, TNFRSF12) gene. *Immunogenetics* 53(1):59-63.

- Wang G, Pan J, Tan YY, Sun XK, Zhang YF, Zhou HY, Ren RJ, Wang XJ & Chen SD (2008a) Neuroprotective effects of PACAP27 in mice model of Parkinson's disease involved in the modulation of K(ATP) subunits and D2 receptors in the striatum. *Neuropeptides* 42(3):267-276.
- Wang G, Qi C, Fan GH, Zhou HY & Chen SD (2005) PACAP protects neuronal differentiated PC12 cells against the neurotoxicity induced by a mitochondrial complex I inhibitor, rotenone. *FEBS Lett.* 579(18):4005-4011.
- Wang H, Ye Y, Zhu Z, Mo L, Lin C, Wang Q, Wang H, Gong X, He X, Lu G, Lu F & Zhang S (2016b) MiR-124 Regulates Apoptosis and Autophagy Process in MPTP Model of Parkinson's Disease by Targeting to Bim. *Brain Pathol.* 26(2):167-176.
- Wang LH & Johnson EM, Jr. (2008b) Mixed lineage kinase inhibitor CEP-1347 fails to delay disability in early Parkinson disease. *Neurology* 71(6):462; author reply 462-463.
- Wang Q, Liu Y & Zhou J (2015) Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Transl Neurodegener* 4:19.
- Wang XM, Zhang YG, Li AL, Long ZH, Wang D, Li XX, Xia JH, Luo SY & Shan YH (2016c) Relationship between levels of inflammatory cytokines in the peripheral blood and the severity of depression and anxiety in patients with Parkinson's disease. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 20(18):3853-3856.
- Warren JB, Cockcroft JR, Larkin SW, Kajekar R, Macrae A, Ghatei MA & Bloom SR (1992) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is a potent vasodilator in humans. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20(1):83-87.
- Waschek JA (2013) VIP and PACAP: neuropeptide modulators of CNS inflammation, injury, and repair. *Br. J. Pharmacol.* 169(3):512-523.
- Waschek JA, Casillas RA, Nguyen TB, DiCicco-Bloom EM, Carpenter EM & Rodriguez WI (1998) Neural tube expression of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and receptor: potential role in patterning and neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95(16):9602-9607.
- Watanabe J, Ohno F, Shioda S, Kikuyama S, Nakaya K & Nakajo S (2006) Involvement of protein kinase C in the PACAP-induced differentiation of neural stem cells into astrocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1070:597-601.
- Watson MB, Nobuta H, Abad C, Lee SK, Bala N, Zhu C, Richter F, Chesselet MF & Waschek JA (2013) PACAP deficiency sensitizes nigrostriatal dopaminergic neurons to paraquat-induced damage and modulates central and peripheral inflammatory activation in mice. *Neuroscience* 240:277-286.
- Watson MB, Richter F, Lee SK, Gabby L, Wu J, Masliah E, Effros RB & Chesselet MF (2012) Regionally-specific microglial activation in young mice over-expressing human wildtype alpha-synuclein. *Exp. Neurol.* 237(2):318-334.
- Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN & Rubinsztein DC (2003) Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem.* 278(27):25009-25013.
- Wee Yong V (2010) Inflammation in neurological disorders: a help or a hindrance? *Neuroscientist* 16(4):408-420.
- Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M & Levine B (2008) JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol. Cell* 30(6):678-688.
- Weil-Malherbe H & Bone AD (1959) The effect of reserpine on the intracellular distribution of catecholamines in the brain stem of the rabbit. *J. Neurochem.* 4:251-263.

- Wilms H, Zecca L, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G & Lucius R (2007) Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications. *Curr. Pharm. Des.* 13(18):1925-1928.
- Winklhofer KF & Haass C (2010) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1802(1):29-44.
- Wirth M, Joachim J & Tooze SA (2013) Autophagosome formation--the role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage. *Semin. Cancer Biol.* 23(5):301-309.
- Wong AS, Lee RH, Cheung AY, Yeung PK, Chung SK, Cheung ZH & Ip NY (2011) Cdk5-mediated phosphorylation of endophilin B1 is required for induced autophagy in models of Parkinson's disease. *Nat. Cell Biol.* 13(5):568-579.
- Wray V, Kakoschke C, Nokihara K & Naruse S (1993) Solution structure of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 32(22):5832-5841.
- Wu DC, Tieu K, Cohen O, Choi DK, Vila M, Jackson-Lewis V, Teismann P & Przedborski S (2002) Glial cell response: A pathogenic factor in Parkinson's disease. *J. Neurovirol.* 8(6):551-558.
- Wu JJ, Quijano C, Chen E, Liu H, Cao L, Fergusson MM, Rovira, II, Gutkind S, Daniels MP, Komatsu M & Finkel T (2009) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress mediate the physiological impairment induced by the disruption of autophagy. *Aging* 1(4):425-437.
- Xie HR, Hu LS & Li GY (2010) SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin. Med. J. (Engl.)* 123(8):1086-1092.
- Xiong N, Xiong J, Jia M, Liu L, Zhang X, Chen Z, Huang J, Zhang Z, Hou L, Luo Z, Ghoorah D, Lin Z & Wang T (2013) The role of autophagy in Parkinson's disease: rotenone-based modeling. *Behav Brain Funct* 9:13.
- Xu Q & Si LY (2010) Protective effects of AMP-activated protein kinase in the cardiovascular system. *J. Cell. Mol. Med.* 14(11):2604-2613.
- Xu YD, Cui C, Sun MF, Zhu YL, Chu M, Shi YW, Lin SL, Yang XS & Shen YQ (2017) Neuroprotective Effects of Loganin on MPTP-Induced Parkinson's Disease Mice: Neurochemistry, Glial Reaction and Autophagy Studies. *J. Cell. Biochem.* 10.1002/jcb.26010.
- Yan MH, Wang X & Zhu X (2013) Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic. Biol. Med.* 62:90-101.
- Yang H, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ & Pavletich NP (2013) mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* 497(7448):217-223.
- Yang Q & Mao Z (2010a) Dysregulation of autophagy and Parkinson's disease: the MEF2D link. *Apoptosis* 15(11):1410-1414.
- Yang Q & Mao Z (2010b) Parkinson disease: a role for autophagy? *Neuroscientist* 16(4):335-341.
- Yang R, Jiang X, Ji R, Meng L, Liu F, Chen X & Xin Y (2015) Therapeutic potential of PACAP for neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 20(2):265-278.
- Yang S, Yang J, Yang Z, Chen P, Fraser A, Zhang W, Pang H, Gao X, Wilson B, Hong JS & Block ML (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 38 and PACAP4-6 are neuroprotective through inhibition of NADPH oxidase: potent regulators of microglia-mediated oxidative stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319(2):595-603.

- Yang Z & Klionsky DJ (2010c) Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22(2):124-131.
- Yokoyama H, Kuroiwa H, Yano R & Araki T (2008) Targeting reactive oxygen species, reactive nitrogen species and inflammation in MPTP neurotoxicity and Parkinson's disease. *Neurol. Sci.* 29(5):293-301.
- Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH & Lenardo MJ (2004) Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 304(5676):1500-1502.
- Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM & Dawson VL (2002) Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297(5579):259-263.
- Yuste JE, Tarragon E, Campuzano CM & Ros-Bernal F (2015) Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 9:322.
- Zech R, Kiontke S, Mueller U, Oeckinghaus A & Kummel D (2016) Structure of the Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2) N Terminus Provides Insight into Complex Assembly and Tuberous Sclerosis Pathogenesis. *J. Biol. Chem.* 291(38):20008-20020.
- Zhang L, Dong Y, Xu X & Xu Z (2012) The role of autophagy in Parkinson's disease. *Neural Regen Res* 7(2):141-145.
- Zhang S, Wang XJ, Tian LP, Pan J, Lu GQ, Zhang YJ, Ding JQ & Chen SD (2011) CD200-CD200R dysfunction exacerbates microglial activation and dopaminergic neurodegeneration in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neuroinflammation* 8:154.
- Zhang XJ, Chen S, Huang KX & Le WD (2013) Why should autophagic flux be assessed? *Acta Pharmacol. Sin.* 34(5):595-599.
- Zhang Y, Wu JY, Weng LH, Li XX, Yu LJ & Xu Y (2017) Valproic acid protects against MPP+-mediated neurotoxicity in SH-SY5Y Cells through autophagy. *Neurosci. Lett.* 638:60-68.
- Zheng S, Han F, Shi Y, Wen L & Han D (2017) Single-Prolonged-Stress-Induced Changes in Autophagy-Related Proteins Beclin-1, LC3, and p62 in the Medial Prefrontal Cortex of Rats with Post-traumatic Stress Disorder. *J. Mol. Neurosci.* 62(1):43-54.
- Zheng Y, Hou J, Liu J, Yao M, Li L, Zhang B, Zhu H & Wang Z (2014) Inhibition of autophagy contributes to melatonin-mediated neuroprotection against transient focal cerebral ischemia in rats. *J. Pharmacol. Sci.* 124(3):354-364.
- Zhou CJ, Kikuyama S, Nakajo S, Arimura A & Shioda S (2000) Ontogeny of PACAP receptor and its splice variants in the rat brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 921:375-376.
- Zhou F, Wu JY, Sun XL, Yao HH, Ding JH & Hu G (2007) Iptakalim alleviates rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons through inhibiting microglia-mediated neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology* 32(12):2570-2580.
- Zhou H, Chen J, Lu X, Shen C, Zeng J, Chen L & Pei Z (2012) Melatonin protects against rotenone-induced cell injury via inhibition of Omi and Bax-mediated autophagy in Hela cells. *J. Pineal Res.* 52(1):120-127.
- Zhou YY, Li Y, Jiang WQ & Zhou LF (2015) MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway. *Biosci. Rep.* 35(3).

- Zhu BT (2004) CNS dopamine oxidation and catechol-O-methyltransferase: importance in the etiology, pharmacotherapy, and dietary prevention of Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Med.* 13(3):343-353.
- Zhu J, Mix E & Winblad B (2001) The antidepressant and antiinflammatory effects of rolipram in the central nervous system. *CNS drug reviews* 7(4):387-398.
- Zhu JH, Guo F, Shelburne J, Watkins S & Chu CT (2003a) Localization of phosphorylated ERK/MAP kinases to mitochondria and autophagosomes in Lewy body diseases. *Brain pathology* 13(4):473-481.
- Zhu JH, Horbinski C, Guo F, Watkins S, Uchiyama Y & Chu CT (2007) Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death. *Am. J. Pathol.* 170(1):75-86.
- Zhu L, Tamvakopoulos C, Xie D, Dragovic J, Shen X, Fenyk-Melody JE, Schmidt K, Bagchi A, Griffin PR, Thornberry NA & Sinha Roy R (2003b) The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: in vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1-38). *J. Biol. Chem.* 278(25):22418-22423.