

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

**Développement d'un modèle de la maladie de Parkinson
avec lésion nigrale bilatérale et dyskinésies provoquées
par L-DOPA, dans le but d'optimiser le rétablissement
dopaminergique défaillant : caractérisation
comportementale, histologique et moléculaire.**

THÈSE DE DOCTORAT

**Ecole Doctorale : CHIMIE-BIOLOGIE
Discipline : Médecine
Spécialité : Neurosciences**

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Vincent PAILLÉ

le 26 avril 2005, devant le jury ci-dessous :

<i>Président</i>	Pr Philippe MENEI, CHU d'Angers
<i>Rapporteurs</i>	Dr Marc SAVASTA, INSERM U704, Grenoble Pr François TISON, CNRS UMR 5543, Bordeaux2
<i>Examineur</i>	Dr Stéphane PALFI, Hôpital Henri Mondor, Créteil

Directeur de thèse : Pr Philippe DAMIER

Publications

Publications originales en rapport avec le sujet de thèse :

- Paillé V, Melchior B, Henry V, Thinard R, Louvet C, Lescaudron L, Brachet P and Damier P. *Temporal expression of trophic factor and inflammation marker mRNA in a bilateral rat model of Parkinson's disease* (en préparation).
- Paillé V, Lescaudron L, Brachet P and Damier P. *New rat model of Parkinson's disease with bilateral nigral lesion, Motor Abnormalities Reversible with Levodopa and Dyskinesias* (soumis).
- Paillé V, Brachet P and Damier P. *Role of nigral lesion in the genesis of dyskinesias in a rat model of Parkinson's disease*. Neuroreport 2004 Mar 1;15(3):561-4.

Autre publication :

- Rémy S, Naveilhan P, Paillé V, Brachet P and Neveu I. *Lipopolysaccharide and TNF α regulate the expression of GDNF, neurturin and their receptors*. Neuroreport 2003 14 (11): 1529-34. (dans l'addendum)

Publication à caractère didactique

- Paillé V and Spampinato U. *Le rat : un bon modèle de la maladie de Parkinson ?* Neurologies (sous presse).

SOMMAIRE

ABREVIATIONS

12

INTRODUCTION

14

1 LA MALADIE DE PARKINSON

13

1.1 SYMPTOMATOLOGIE

13

1.1.1 ATTEINTES MOTRICES 13

1.1.2 ATTEINTES COGNITIVES ET PSYCHIATRIQUES 14

1.2 ANATOMO-PATHOLOGIE

14

1.2.1 LES CORPS DE LEWY 15

1.2.2 LA PERTE DOPAMINERGIQUE 16

1.2.3 LES SYSTEMES NON DOPAMINERGIQUES 18

1.3 ORGANISATION ANATOMO-FONCTIONNELLE DES GANGLIONS DE LA BASE: LE MODELE DU

DOUBLE CIRCUIT

20

1.3.1 A L'ETAT NORMAL 20

1.3.2 A L'ETAT PARKINSONNIEN 23

1.4 ETIOLOGIES DE LA MALADIE DE PARKINSON

24

1.4.1 FACTEURS GENETIQUES 24

1.4.2 FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX 25

1.4.3 ORIGINE MULTIFACTORIELLE 26

1.5 MECANISMES DE LA MORT NEURONALE

26

1.5.1 ROLE DU SYSTEME UBIQUITINE PRETEASOME 27

1.5.2 ROLE DES FACTEURS DE CROISSANCES 28

1.5.3 ROLE DU CALCIUM, DU GLUTAMATE ET DES PHENOMENES D'EXCITOTOXICITE 29

1.5.4 ROLE DU STRESS OXYDATIF 30

1.5.4.1 Les neurones DA sont exposés à de grandes quantités de radicaux libres 32

1.5.4.2 Rôle étiologique du stress oxydatif dans d'autres affections neurodégénératives et dans d'autres syndromes parkinsoniens 33

1.5.4.3 La sous-population des neurones DA la plus exposée au stress oxydatif est la plus affectée dans la maladie de Parkinson 34

1.5.4.4 Indices et facteurs de stress oxydatif dans le mésencéphale de patients atteints de la maladie de Parkinson 35

1.5.5 MECANISMES FINAUX : L'APOPTOSE 36

1.5.6 ROLES CONTRASTES DE LA GLIE 40

1.5.6.1 Les cellules gliales 40

1.5.6.1.1 Les oligodendrocytes 40

1.5.6.1.2	Les astrocytes	41
1.5.6.1.3	La microglie	42
1.5.6.2	L'effet délétère de la glie dans la maladie de Parkinson	47
1.5.6.3	L'effet protecteur des cellules gliales	49
1.5.6.4	Conclusion	51

2 LES MODELES ACTUELS DE LA MALADIE **51**

2.1 INTERETS DES MODELES ANIMAUX **52**

2.2 LES DIFFERENTES ESPECES ANIMALES UTILISEES **54**

2.3 LES DIFFERENTS MODELES **55**

2.3.1	LES MODELES GENETIQUES : LA SOURIS PORTEUSE D'UNE MUTATION SUR LE GENE DE L' α -SYNUCLEINE	55
2.3.2	LES MODELES PAR INJECTION D'UN TOXIQUE	56
2.3.2.1	Le modèle roténone	56
2.3.2.2	Le modèle obtenu par inhibition du protéasome	58
2.3.2.3	Les modèles MPTP	61
2.3.2.4	Les modèles de rats 6 OHDA	66
2.3.2.4.1	La toxicité de la 6-OHDA	66
2.3.2.4.2	Critique des modèles de rats 6 OHDA actuels	68
2.3.2.4.2.1	Le modèle classique	69
2.3.2.4.2.2	Les nouveaux modèles	70
2.3.2.4.3	Aspects comportementaux des lésions à la 6-OHDA	73

2.4 CONCLUSION **75**

3 ASPECTS THERAPEUTIQUES **76**

3.1 APPROCHE PHARMACOLOGIQUE **76**

3.1.1	LES AGENTS DOPAMINERGIQUES	78
3.1.1.1	La L-DOPA	78
3.1.1.2	Les agonistes dopaminergiques	79
3.1.1.3	Inhibiteurs enzymatiques	81
3.1.2	AGENTS NON-DOPAMINERGIQUES	81
3.1.2.1	Les anti-cholinergiques	82
3.1.2.2	Les antagonistes glutamatergiques	82

3.2 LE TRAITEMENT CHIRURGICAL **83**

3.3 PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES **84**

3.3.1	THERAPIES VISANT A AGIR SUR LE PROCESSUS DEGENERATIF	84
3.3.1.1	Les traitements anti-oxydants	84
3.3.1.2	Les traitements anti-apoptotiques	87
3.3.1.3	Les thérapies anti-excitotoxiques	88
3.3.1.4	Les traitements anti-inflammatoires	89

3.3.1.5	Les facteurs neurotrophiques	92
3.3.2	LES GREFFES DE TISSUS EMBRYONNAIRES	95
3.3.2.1	L'expérimentation animale	95
3.3.2.2	L'allogreffe en clinique	96
3.3.2.2.1	Le suivi des greffes intra-striatales chez l'homme : l'imagerie par TEP	96
3.3.2.2.2	Les essais cliniques	98

3.4	CONCLUSION	101
-----	------------	-----

OBJECTIFS 105

1 DEVELOPPEMENT D'UN MODELE DE RATS PRESENTANT DES DYSKINESIES 104

2 DEVELOPPEMENT D'UN MODELE ANIMAL LE PLUS PROCHE POSSIBLE DE LA MALADIE DE PARKINSON HUMAINE 105

3 CARACTERISATION, D'UN POINT DE VUE MOLECULAIRE, DE L'ENVIRONNEMENT TROPHIQUE ET IMMUNOLOGIQUE DE CE MODELE 105

4 QUELLE EST LA METHODE LA PLUS PHYSIOLOGIQUE DE RETABLISSEMENT DOPAMINERGIQUE POUR TRAITER LA MALADIE DE PARKINSON ? 106

CONSIDERATIONS METHODOLOGIQUES 110

1 MODELES 6-OHDA UTILISES 109

1.1 LESIONS UNILATERALES 109

1.2 LESIONS BILATERALES 110

2 ANALYSE COMPORTEMENTALE 111

3 MARQUAGE IMMUNOHISTOCHEMIE (PRINCIPE) 112

4 METHODOLOGIES D'ANALYSE QUANTITATIVE DE LA PERTE NEURONALE 113

4.1 METHODE (DECRIE PAR SAUER ET OERTEL) 113

4.2 QUANTIFICATION EN UTILISANT UN SYSTEME DE COMPTAGE 114

5 EXTRACTION D'ARN ET RETROTRANSCRIPTION 114

6 ANALYSE SEMI-QUANTITATIVE PAR PCR EN TEMPS REEL (TAQMAN®) 116

RESULTATS

1 DEVELOPPEMENT D'UN MODELE DE RAT PRESENTANT DES DYSKINESIES

1.1 TRAVAUX PRELIMINAIRES, DEVELOPPEMENT D'UN MODELE UNILATERAL ET VALIDATION

IMMUNOHISTOCHIMIQUE

1.1.1 PRESENTATION

1.1.2 PRINCIPAUX RESULTATS

1.1.2.1 Aspects comportementaux

1.1.2.2 Aspects histologiques

1.1.3 CONCLUSION

1.2 CARACTERISATION DES DYSKINESIES SOUS L-DOPA SUR UN MODELE UNILATERAL PARTIEL

DE LA MALADIE DE PARKINSON

1.2.1 PRESENTATION

1.2.2 PRINCIPAUX RESULTATS

ARTICLE N°1

2 DEVELOPPEMENT D'UN MODELE ANIMAL LE PLUS PROCHE POSSIBLE DE LA MALADIE DE PARKINSON HUMAINE

2.1 PRESENTATION

2.2 PRINCIPAUX RESULTATS

ARTICLE N°2

3 CARACTERISATION MOLECULAIRE DE CE MODELE

3.1 PRESENTATION

3.2 PRINCIPAUX RESULTATS

ARTICLE N°3

4 OPTIMISATION DU RETABLISSEMENT DOPAMINERGIQUE

4.1 PRINCIPE

4.2 METHODES

4.2.1 ANIMAUX

4.2.1.1 Répartition des animaux dans les différents lots de traitement

4.2.2 TRAITEMENTS

4.2.3	ANALYSE	144
4.2.3.1	Analyse comportementale	144
4.2.3.2	Analyse anatomobiochimique	146

4.3 RESULTATS PRELIMINAIRES 148

4.3.1	ASPECTS COMPORTEMENTAUX	148
4.3.1.1	Comportements après la lésion	148
4.3.1.2	La présélection	149
4.3.1.3	Effets des greffes et de la L-DOPA	149
4.3.2	ASPECTS HISTOLOGIQUES	152
4.3.3	DISCUSSION	153

DISCUSSION GENERALE 156

1 LES AVANTAGES DU MODELE DE MALADIE DE PARKINSON BILATERAL CHEZ LE RAT, DANS UNE APPROCHE THERAPEUTIQUE EXPERIMENTALE 155

1.1	LA VIABILITE PERMISE PAR UN « ENCADREMENT » DE LA PERIODE CRITIQUE POST- LESIONNELLE	155
1.2	LA DISTRIBUTION DES LESIONS PROCHE DE CELLE DE LA MALADIE HUMAINE	155
1.3	L'ABSENCE DE PHENOMENE DE COMPENSATION TRANSEMISSPHERIQUE	156
1.4	UNE EVALUATION « CLINIQUE » SENSIBLE ET SPECIFIQUE	157
1.5	LE DEVELOPPEMENT DE DYSKINESIES PROVOQUEES PAR LA L-DOPA	158
1.6	LES LIMITES DE CE MODELE	159
1.7	LES INTERETS DE CE MODELE EN THERAPEUTIQUE EXPERIMENTALE	160

2 LA CINETIQUE DES PHENOMENES INFLAMMATOIRES ET NEUROTROPHIQUES ASSOCIES A LA DESTRUCTION DES NEURONES DOPAMINERGIQUE PAR LA 6-OHDA 161

2.1	PCR QUANTITATIVE	161
2.2	ANALYSE MOLECULAIRE	162
2.3	CONCLUSION	163

3 EFFICACITE DES GREFFES 164

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 168**1 APPORT DE CE TRAVAIL** 167**2 PERSPECTIVES** 169

BIBLIOGRAPHIE 173

ADDENDUM 209

Abréviations

¹¹C CFT : Carbon-11-labeled 2-carbomethoxy-3 [4-fluorophenyl] tropane
6-OHDA : Hydroxy-6-dopamine ou 6-hydroxydopamine (anglosaxon)
7-NI : 7-nitroindazole
Ac.-YVAD-cmk : Acétyle-tyrosine-valine-alanine-aspartate-chloromethylketone
Ac-DEVD-CHO : Acétyle-aspartate-glutamate-valine-aspartate-aldéhyde
ADN : Acide désoxyribonucléique
AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien
AM : Acide malonique
Apaf-1 : Apoptotic protease-activating factor 1
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine tri-phosphate
ATV : Aire tegmentale ventrale
BDNF : Brain-derived neurotrophic factor
BHE : Barrière hématoencéphalique
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
COMT : Catéchol-O-méthyl-transférase
COX 2 : Cyclooxygénase 2
CPP : Acide 3-((2)-2- carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphoric
DA : Dopamine ou dopaminergique
DAB : Diaminobenzidine
DATATOP : Deprenyl and tocopherol antioxidant therapy of Parkinson disease
DRO : Dérivés réactifs de l'oxygène
FMT : Faisceau médian du télencéphale
GDNF : Glial-derived neurotrophic factor
GFAP : Glial fibrillary acidic protein
GPe : Globus pallidus externe
GPi : Globus pallidus interne
GPx : Glutathion peroxydase
GSSG : Glutathion oxydé
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HPRT : Hypoxanthine Phosphoribosyl transferase
IFN_γ : Interféron gamma
IL1 β : Interleukine 1 bêta
iNOS : Inducible nitric oxide synthase
KO : Knock out
LCA : Leukocyte common antigen
LCR : Liquide céphalo-rachidien
L-DOPA : Lévodopa
L-NAME : N^o-nitro-L-arginine methyl ester
MAIs : Mouvements anormaux involontaires
MAO_B : Monoamine oxydase B
MP : Maladie de Parkinson
MPTP : 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NAD : Nicotinamide adenine dinucleotide
NF κ B : Nuclear factor kappa B

NMEs : Neurones moyens épineux du striatum
NO : Nitric oxyde
NOS : Nitric oxide synthase
NST : Noyau subthalamique
NT3 : Neurotrophin 3
O₂⁻ : Anion radical superoxyde
OH[•] : Radical hydroxyle
ONOO⁻ : Peroxynitrique
PARS : Poly(ADP-ribose)
PFA : Paraformaldéhyde
PPAR- γ : Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma
RT : Réverse transcription
SEP : Sclérose en plaque
SLA : Sclérose latérale amyotrophique
SNC : Système Nerveux Central
SNpc : Substantia nigra pars compacta
SNpr : Substantia nigra pars réticulata
SOD : Superoxyde dismutase
SPD : Sprague Dawley
SUP : Système ubiquitine protéasome
TDA : Transporteur de la dopamine
TEP : Tomographie à émission de positons
TH : Tyrosine Hydroxylase
TNF α : Tumor necrosis factor alpha
TUNEL : terminal deoxytransferase- mediated dUTP-biotin nick end labelling
UPDRS : Unified Parkinson's disease rating scale
zVAD-fmk : N-benzyloxycarbonylvaline-alanine-aspartate-(OMe)- fluoromethylketone
TGF β 1 : Transforming Growth factor beta 1

INTRODUCTION

1 La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson, avec une prévalence de 1‰ personnes, est en fréquence la deuxième affection neurodégénérative. En raison du vieillissement démographique, cette prévalence tend encore à augmenter, ce qui confère à cette affection un poids socio-économique non négligeable.

1.1 Symptomatologie

1.1.1 Atteintes motrices

Cette maladie, décrite pour la première fois par James Parkinson en 1817 comme une "paralysie agitante", peut se définir comme l'association d'un trouble clinique, le syndrome parkinsonien, à des lésions neuropathologiques caractéristiques : raréfaction des neurones pigmentés du tronc cérébral, plus particulièrement de la substantia nigra pars compacta (SNpc) et présence de corps de Lewy, inclusions intracytoplasmiques éosinophiles, dans les neurones survivants.

D'un point de vue clinique (pour revue Fenelon., 1997 ; Damier., 2002), on s'accorde pour

décrire sous le nom de syndrome parkinsonien l'association entre tremblement de repos, akinésie/bradykinésie (difficulté à l'initiation des mouvements et une lenteur) et rigidité. Ils peuvent concerner les membres supérieurs (tremblements, rigidité, akinésie) et gêner la gestuelle manuelle mais aussi les membres inférieurs (akinésie



Figure 1 : Attitude d'un patient parkinsonien debout.
Statue de Paul Richer

et rigidité) le contrôle postural et ainsi perturber la marche et parfois l'équilibre. Ces manifestations cliniques se combinent entre elles selon les patients. La maladie de Parkinson n'est pas la cause exclusive de syndromes parkinsoniens. En effet, de nombreuses causes peuvent être à l'origine d'un syndrome parkinsonien, comme certaines drogues (neuroleptiques), certaines maladies métaboliques (maladie de Wilson), neurodégénératives (paralysie supranucléaire progressive) ou encore certaines encéphalites (Dubois., 1993 ; Lang et Lozano., 1998).

1.1.2 Atteintes cognitives et psychiatriques

La maladie de Parkinson est une maladie motrice mais les patients peuvent également présenter des troubles cognitifs et des désordres psychiatriques même en dehors de toute détérioration intellectuelle globale ou démence. Si ces manifestations sont moins prononcées et affectent moins la vie quotidienne des malades que les troubles moteurs, elles peuvent néanmoins avoir une grande importance pour le patient, en particulier pour sa vie professionnelle et sociale ainsi que pour son entourage, et compliquent sa prise en charge. (pour revue Fénélon., 1997 ; Damier., 2002).

1.2 Anatomo-pathologie

L'examen anatomo-pathologique est le seul examen qui nous permet un diagnostic certain de la maladie de Parkinson. En effet, la maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui se définit par deux stigmates anatomo-pathologiques, la perte neuronale et la présence d'inclusions neuronales appelées corps de Lewy, et l'exclusion de tout autre cause, vasculaire, traumatique, métabolique ... (Vidailhet., 2000 ; Viallet., 2000).

1.2.1 Les corps de Lewy

Les corps de Lewy sont des inclusions neuronales éosinophiles, sphériques, de 5 à 25 μm de diamètre environ (figure 2a). Ces inclusions présentent un cœur dense et un halo périphérique plus clair (Lang et Lozano., 1998 ; Goedert et coll., 1998). L'observation ultrastructurale des corps de Lewy (figure 2c) révèle une structure granuleuse et filamenteuse du cœur de l'inclusion et un aspect filamenteux, radiaire de la couronne périphérique (Goedert et coll., 1998). Il est difficile de savoir si la présence des corps de Lewy est le signe d'une souffrance cellulaire et s'ils participent au processus dégénératif (Agid., 1991 ; Agid et coll., 1993 ; Langston., 1996). La présence de neurofilaments et

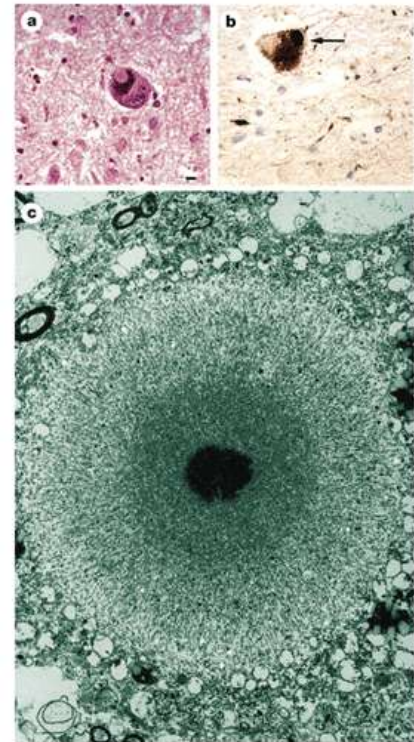


Figure 2 : Les corps de Lewy

Les corps de lewy son des inclusions éosinophiles (a), qui contiennent de l' α -synucléine (b). Ils sont constitués d'un cœur dense et granulaire et d'une couronne d'aspect filamenteux (c).

D'après Beal et coll. (2001)

de tubuline (composant principal des microtubules) au sein des corps de Lewy suggère une altération du cytosquelette (Goldman et coll., 1983 ; Gibb et coll., 1991). La présence d' α -synucléine (figure 2b) dans les corps de Lewy est particulièrement intéressante car certaines formes génétiques de la maladie de Parkinson sont dues à des mutations du gène codant pour cette protéine (Polymeropoulos et coll., 1997). De plus, la présence d'ubiquitine suggère également que des défauts d'agrégations ou de dégradations des protéines pourraient participer au processus pathologique (Leroy et coll., 1998).

Les corps de Lewy sont présents dans les neurones DA de la SNpc (Gibb et Lees, 1991 ; Agid et coll., 1993) mais ils sont également retrouvés au sein d'autres

populations catécholaminergiques (Halliday et coll., 1990 ; Jellinger, 1991). De plus, si les corps de Lewy ne sont pas spécifiques de la SNpc, ils ne sont pas non plus spécifiques de la maladie de Parkinson (Gibb et Lees, 1989), puisqu'ils sont aussi observés dans la maladie d'Alzheimer et même au cours du vieillissement normal (Fearnley et Lees, 1991).

1.2.2 La perte dopaminergique

La maladie de Parkinson est une affection neurodégénérative du système nerveux central caractérisée par une destruction massive et progressive des neurones dopaminergiques de la substantia nigra pars compacta de manière bilatérale (Hornykiewicz, 1966). La perte de ces neurones provoque une diminution de concentration en dopamine au niveau du striatum, ce qui conduit à une perturbation du fonctionnement des ganglions de la base. La plus part des neurones dopaminergiques contenant un pigment brunâtre, la neuromélanine, leur perte explique la dépigmentation caractéristique de la substance noire observée à l'examen macroscopique (figure 3).

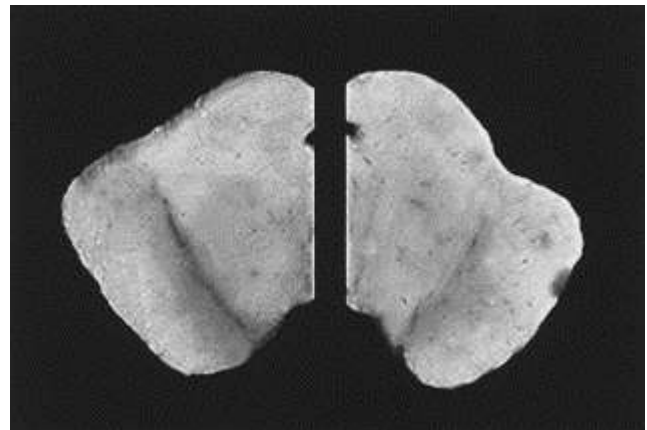


Figure 3 : Coupe de mésencéphale humain au niveau de la substance noire
Dépigmentation caractéristique de la Substance Noire chez un sujet parkinsonien (droite) par rapport à un sujet témoin (gauche)
D'après Alexi et coll. (2000)

Bien que de très grandes variabilités inter-individuelles soient observées, les grands groupes de neurones dopaminergiques ne sont pas tous atteints de la même manière. La SNpc est la région la plus sévèrement touchée et accuse une perte neuronale d'environ 80 %. Les neurones dopaminergiques de la substance grise

périaqueudale semblent relativement préservés du processus dégénératif puisque seulement une perte neuronale de 7 à 10 % est constatée. La région médio-ventrale (ou aire tegmentale ventrale, ou A10) et l'aire péri- et rétro-rubrale (A8) présentent une perte intermédiaire de 30 à 45 % (Hirsch et coll., 1988 ; Graybiel et coll., 1990a ; Damier et coll., 1999b). Certains neurones dopaminergiques, comme ceux de l'hypothalamus, sont épargnés (Matzuk et Saper., 1985). Par ailleurs, quelle que soit la région dopaminergique affectée, il existe un gradient rostro-caudal de la perte neuronale; les territoires postérieurs de chaque région étant plus sévèrement atteints que les territoires antérieurs (Bernheimer et coll., 1973; Damier et coll., 1999b).

Depuis longtemps, on sait que la perte neuronale au sein de la substance noire est hétérogène. En plus du gradient rostro-caudal déjà évoqué, on s'aperçoit sur des coupes transversales que la région ventro-latérale est la plus sévèrement atteinte (Fearnley et Lees, 1991; Damier et coll., 1999b). La perte neuronale dans la partie dorsale, parfois appelée substance noire pars dorsalis, (Hirsch et coll., 1988; Damier et coll., 1999a) est quant à elle plus modérée (Damier et coll., 1999b). A cette distribution particulière de la perte neuronale au sein du mésencéphale, correspond une distribution particulière du déficit en DA au sein des cibles de projection, entre autres le striatum (Haber et Fudge, 1997; François et coll., 1999; Joel et Weiner, 2000; Smith et Kieval, 2000). La perte de fibres immunoréactives pour la tyrosine hydroxylase est plus importante au sein du putamen (85 %) que dans le noyau caudé (75 %) et au sein de ces deux structures, le déficit est plus important dans les parties dorso-latérales que dans les parties ventro-médianes (Kish et coll., 1988; Graybiel., 1990a; Agid et coll., 1993). Or la région dorso-latérale du putamen, région la plus sévèrement dénervée, correspond au territoire sensori-moteur du striatum (Künzle, 1975). La topographie des lésions DA de la substance noire et donc les

variations du niveau de dénervation au sein du striatum peuvent contribuer à expliquer le caractère essentiellement moteur de la maladie de Parkinson. Des différences inter-individuelles d'intensité ou de distribution de la perte des neurones dopaminergiques pourraient expliquer certaines différences cliniques observées d'un patient à l'autre en particulier le site de la symptomatologie initiale (Gibb et Lees., 1991; Lang et Lozano., 1998).

On considère qu'il faut à peu près 70 à 80 % de perte de dopamine au sein du striatum et 50 à 60 % de perte cellulaire au sein de la substance noire pour qu'apparaissent les premiers signes cliniques (Agid, 1991; Agid et coll., 1993). Le rythme de la perte neuronale est difficile à évaluer, ainsi que la durée de la phase présymptomatique. Il semble que le processus dégénératif soit d'autant plus rapide que l'âge de début de la maladie est précoce (Agid, 1991; Lang et Lozano., 1998 ; Scherman et coll., 1989).

1.2.3 Les systèmes non dopaminergiques

L'essentiel des symptômes parkinsoniens disparaît à la prise des traitements visant à rétablir les taux physiologiques de dopamine. Toutefois, certains signes cliniques, tels que l'instabilité posturale, les troubles de la marche ou les déficits cognitifs peuvent persister, suggérant que des systèmes non dopaminergiques soient aussi altérés dans la maladie de Parkinson (Agid et coll., 1990). De nombreux marqueurs neurochimiques (neurotransmetteurs, neuropeptides) présentent, de manière très inconstante d'un sujet à un autre, des taux anormaux, diminués ou augmentés, à l'état parkinsonien (Agid et coll., 1990). C'est le cas, entre autres, de la noradrénaline, de la sérotonine, de l'acétylcholine et de plusieurs neuropeptides (cholecystokinine, enképhaline, substance P).

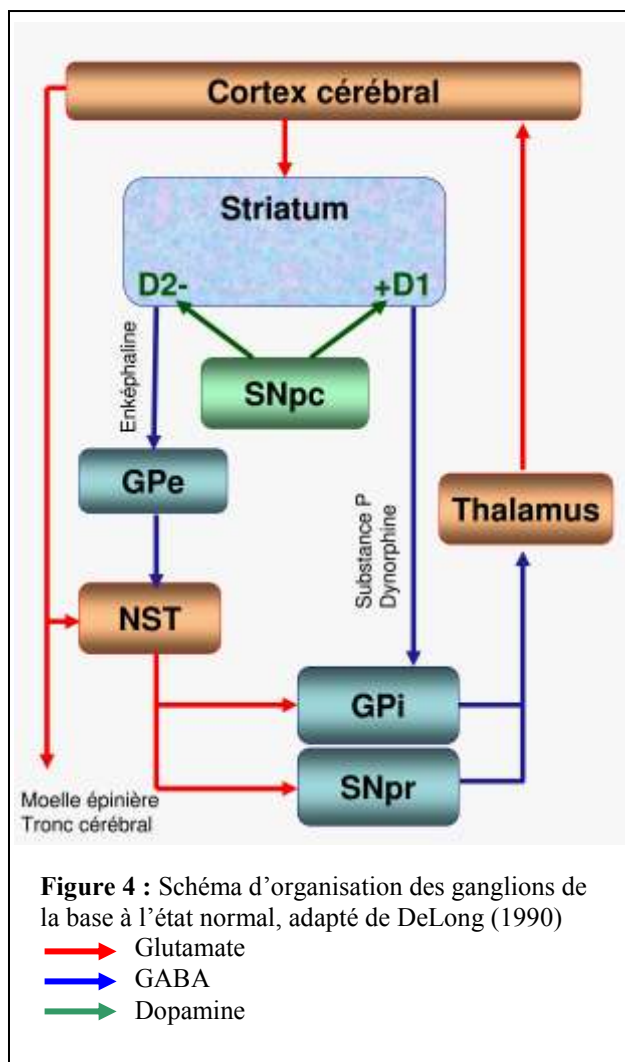
Plusieurs structures non dopaminergiques sont le siège d'une perte cellulaire cérébrale chez les sujets atteints de la maladie de Parkinson. Ces lésions, qui ne sont que partielles et inconstantes, pourraient toutefois rendre compte d'une partie des symptômes non corrigés par le traitement dopaminergique (troubles cognitifs, thymiques, et les troubles de l'équilibre postural) observés dans la maladie, à l'origine parfois de tableaux cliniques complexes. Parmi les structures concernées, on retrouve celles qui contiennent des corps de Lewy (paragraphe 2.1 de ce chapitre). Il a ainsi été décrit une atteinte des neurones noradrénergiques du locus coeruleus, des neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé ou encore des neurones cholinergiques du nucleus basalis de Meynert et du noyau pédonculopontin (Mann et coll., 1983; Arendt et coll., 1983; Hirsch et coll., 1987; Jellinger, 1988; Agid et coll., 1990). La perte des neurones du locus coeruleus et du raphé s'accompagne d'une baisse des taux de noradrénaline et de sérotonine dans de nombreuses régions télencéphaliques et pourrait en partie expliquer les troubles dépressifs et thymiques de certains patients (Agid et coll., 1990). La perte des neurones cholinergiques du nucleus basalis de Meynert pourrait contribuer à la détérioration intellectuelle parfois observée au cours de la maladie. La perte des neurones cholinergiques du noyau pédonculopontin pourrait, quant à elle, contribuer aux troubles moteurs axiaux, posturaux et de la marche. Plus récemment, une perte neuronale a été décrite au sein du complexe centre médian/parafasciculaire du thalamus (Henderson et coll., 2000) mais la conséquence de cette perte n'est pas connue.

1.3 Organisation anatomo-fonctionnelle des ganglions de la base: le modèle du double circuit

Les progrès concernant les connaissances anatomiques et physiologiques des ganglions de la base ont conduit à l'élaboration de modèles d'organisation du système. Il a été proposé initialement par Alexander et coll., une première fois en 1986 puis en 1990, dans le cadre d'une vision paralléliste du traitement de l'information au sein du système. Il a été repris par Albin et coll. (1989), et par DeLong (1990) dans un cadre pathologique. Ce modèle présentait de nombreux avantages dont celui 1) d'être simple et 2) de fournir une explication physiopathologique à certains troubles moteurs de type hypokinétique (maladie de Parkinson) ou hyperkinétique (hémiballisme, maladie de Huntington). Plus de dix ans sont passés et malgré de nombreuses critiques il demeure le modèle d'organisation fonctionnel le plus utilisé.

1.3.1 A l'état normal

Le circuit des ganglions de la base (figure 4) s'inscrit dans une boucle cortico-corticale mais qui n'est pas « symétrique ». En effet, si le cortex cérébral dans sa quasi-totalité projette sur le striatum (à l'exception des cortex, visuel et auditif, primaires), les ganglions de la base projettent, via le thalamus, uniquement sur le cortex frontal. La principale voie d'entrée est le striatum sur lequel le cortex cérébral projette massivement. La projection est glutamatergique et excitatrice. La notion d'un double circuit est basée sur la répartition des neurones épineux (les neurones de projections) en deux populations (Alexander et Crutcher, 1990).



Les premiers, co-expriment avec le GABA deux neuropeptides, la substance P et la dynorphine, et portent à leur surface des récepteurs dopaminergiques de type D1 (Alexander et Crutcher, 1990). Ces neurones projettent directement sur les deux structures de « sortie » des ganglions de la base, le pallidum interne (GPi) et la substance noire pars reticulata (SNpr). Ces deux structures projettent à leur tour sur le cortex frontal via la masse latérale du thalamus. Cette voie qui met en relation directe la structure d'entrée et

celles de sortie des ganglions de la base est dite voie directe. Les neurones des deux structures de sortie sont toniquement actifs. En revanche les neurones du striatum sont particulièrement silencieux. Certains auteurs ont proposé que le circuit fonctionne sur le mode de désinhibition (Chevalier et Deniau, 1990). La voie thalamo-corticale serait à l'état basal toniquement inhibée (rappelons que les voies pallido- et nigro-thalamiques sont GABAergiques). Lorsque le striatum est suffisamment activé par ses afférences corticales, l'activation des voies striato-pallidales et striato-nigrales inhiberaient les voies pallido- et nigro-thalamiques, ce qui lèverait l'inhibition exercée sur la voie thalamo-corticale, glutamatergique excitatrice.

L'activation de cette voie serait facilitatrice du mouvement. La dopamine via les récepteurs D1 portés par les neurones striataux activerait ou faciliterait cette voie, donc le mouvement.

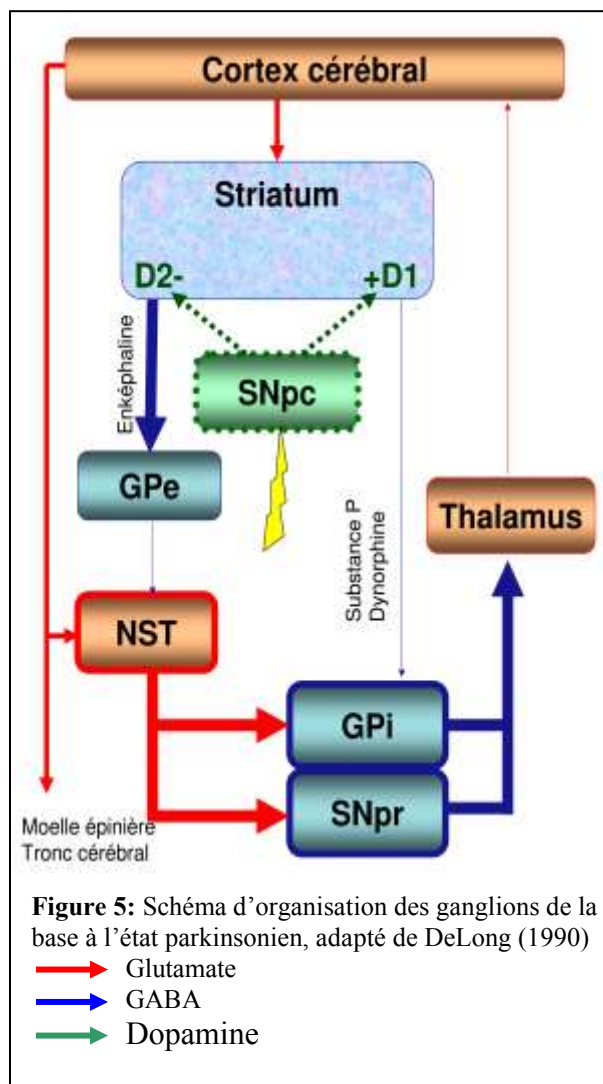
La seconde population striatale de neurones de projection co-exprime avec le GABA un autre neuropeptide, l'enképhaline et porte à sa surface des récepteurs dopaminergiques de type D2 (Alexander et Crutcher, 1990). Ces neurones striataux projettent sur le pallidum externe. Celui-ci projette alors sur le noyau subthalamique (NST) qui à son tour projette sur les deux structures de sortie, le pallidum interne et la substance noire pars reticulata. Cette voie, qui implique deux structures de «relais » entre le striatum et les structures de sortie, est appelée pour cette raison voie indirecte. D'un point de vue fonctionnel, un signal cortical qui entraîne l'activation des neurones striataux provoque l'inhibition de la voie pallido-subthalamique (toniquement active). La désinhibition des neurones du noyau subthalamique se traduit par une activation des voies subthalamo-nigrales et subthalamo-pallidales. Ces deux projections étant excitatrices, l'activité des deux structures de sortie est renforcée. Donc contrairement à la voie directe, l'activation de la voie indirecte entraîne un renforcement de l'inhibition de la voie thalamo-corticale exercée par les deux structures de sortie. On considère la voie indirecte comme inhibitrice du mouvement. La présence de récepteurs D2 au « départ » de cette voie implique que la dopamine exerce un effet inhibiteur sur cette voie et donc par-là même facilite le mouvement.

Pour résumer, le modèle du double circuit propose que les deux structures de sortie soient sous un double contrôle: un contrôle inhibiteur par la voie directe et excitateur par la voie indirecte. On remarque également dans ce modèle le rôle clef

joué par la dopamine et la ségrégation importante des deux types de récepteurs D1 et D2 entre les neurones striataux de la voie directe et ceux de la voie indirecte.

1.3.2 A l'état parkinsonien

La dénervation dopaminergique nigro-striatale va avoir deux conséquences sur les neurones du striatum: une hypoactivation des neurones portant les récepteurs



D1 de la «voie directe» et une hyperactivation des neurones portant les récepteurs D2 de la « voie indirecte » (DeLong, 1990; figure 5). Le modèle prévoit que l'hypoactivation des neurones de la voie directe entraîne, par levée d'inhibition, une hyperactivité des deux structures de sortie et donc une inhibition excessive de la voie thalamo-corticale. Dans le même temps, l'hyperactivation des neurones striataux de la voie indirecte aurait comme conséquence une hypoactivité du pallidum externe et donc une désinhibition du noyau subthalamique. L'hyperactivité du

noyau subthalamique qui en résulterait se traduirait par une hyperactivation des deux structures de sortie. La perte de dopamine entraînerait donc un déséquilibre entre les deux voies directe et indirecte, une hypoactivité de la première, facilitatrice du mouvement, et une hyperactivité de la seconde, inhibitrice du mouvement (DeLong,

1990). Le déséquilibre entre ces deux voies serait donc à l'origine des symptômes de la maladie, en particulier de l'akinésie.

De nombreuses données expérimentales ont montré que les activités du noyau sous thalamique et du pallidum interne sont augmentées dans les syndromes parkinsoniens, comme le prédit le modèle (Bergman et coll., 1990; Limousin et coll., 1995). Ces structures constituent des cibles thérapeutiques, notamment neurochirurgicales chez l'Homme en utilisant des techniques de stimulation cérébrale profonde (cf chapitre 3.2.1).

1.4 Etiologies de la maladie de Parkinson

La ou les causes de la maladie sont encore inconnues. De nombreuses hypothèses ont été proposées, à partir d'observations post-mortem chez l'homme, expérimentales chez l'animal ou in vitro. La difficulté est de discerner les événements à l'origine de la mort neuronale de ceux qui sont une conséquence de la souffrance et de la mort neuronale. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées :

1.4.1 Facteurs génétiques

Même si la forme sporadique idiopathique de la maladie de Parkinson semble être la plus répandue, un facteur génétique unique est impliqué dans 10 à 15% des cas (de Silva et coll. 2000 ; Mouradian, 2002). C'est en effet le pourcentage de cas dans lesquels il existe une apparenté de premier degré atteint (Duvoisin, 1986). De plus, des études réalisées à l'intérieur de paires de jumeaux monozygotes et dizygotes ont montré une concordance forte chez les jumeaux monozygotes (Ward et coll., 1983 ; Piccini et coll., 1999b). Surtout des mutations sont associées à certaines formes familiales de la maladie de Parkinson. A ce jour plusieurs loci ont été identifiés et des mutations ponctuelles des gènes de l' α -synucléine

(Polymeropoulos et coll., 1997), de l'ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (Leroy et coll., 1998) et de la Parkine (Kitada et coll., 1998) ont été mises en évidence.

Le fait que ces trois gènes identifiés soient en relation avec le système ubiquitine/protéasome et que les protéines correspondantes soient présentes dans les corps de Lewy, suggère que des altérations des mécanismes de dégradation, élimination et recyclage des protéines pourraient être impliquées dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson (cf chapitre 1.5.1).

1.4.2 Facteurs environnementaux

L'un des événements les plus marquants en faveur de cette hypothèse est la découverte vers la fin des années 1970, de plusieurs cas de syndrome parkinsonien, survenus brutalement chez de jeunes adultes de la côte californienne. Une étude révéla qu'il s'agissait de toxicomanes ayant reçu dans les jours ou les semaines précédentes, des injections d'un mauvais lot de drogue synthétique illicite, la mépéridine, substitut de l'héroïne. L'autopsie d'un des premiers cas montrait une perte neuronale sélective des neurones dopaminergiques de la substance noire (Davis et coll., 1979). Le produit toxique en cause fut ensuite identifié : le 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), et s'est révélé être un neurotoxique puissant et sélectif des neurones dopaminergiques (Langston et coll., 1983 ; Langston et Balard., 1983 ; Snyder et D'Amato, 1986 ; D'Amato et coll., 1986 ; Burns et coll., 1983 ; Langston et coll., 1984).

Suite à ces observations, des études épidémiologiques ont recherché une éventuelle surexposition des patients atteints de maladie de Parkinson à des agents chimiques de structure proche de celle du MPTP. Ces études, menées aux USA, au Canada, en Chine et en Europe, ont donné dans l'ensemble des résultats concordants en faveur d'une plus grande prévalence de la maladie de Parkinson

dans les pays fortement industrialisés, et plus précisément, dans les zones rurales caractérisées par une importante utilisation de certains produits herbicides, insecticides ou pesticides dont le paraquat, le diquat et la roténone. (Semchuk et coll., 1992 ; pour revue : Le Couteur et coll., 1999). Cependant, aucune substance chimique de type MPTP n'a été isolée et aucun des produits chimiques fabriqués industriellement ne s'est avéré susceptible de provoquer un syndrome parkinsonien idiopathique chez l'homme ou l'animal, ce qui limite la portée de ces résultats épidémiologiques.

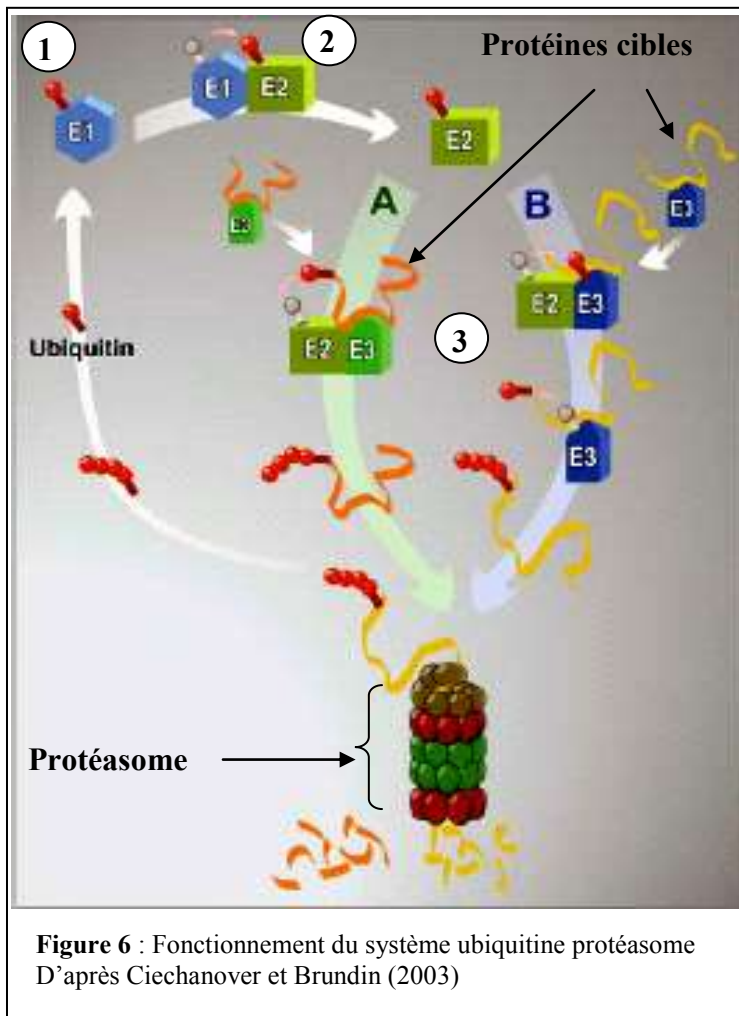
1.4.3 Origine multifactorielle

Dans la plupart des cas, il est probable que la maladie soit d'origine multifactorielle. Le phénotype observé serait la résultante d'un facteur génétique, d'un facteur environnemental et probablement d'un mélange des deux. Ainsi, on pourrait imaginer qu'une prédisposition génétique rendant une personne moins résistante aux toxiques extérieurs pourrait être responsable de la maladie.

1.5 Mécanismes de la mort neuronale

Même si la cause de la maladie est encore inconnue, les mécanismes à l'origine de la mort neuronale se précisent.

1.5.1 Rôle du système ubiquitine protéasome



Le protéasome est un complexe enzymatique de protéolyse. Les protéines anormales vont être adressées au protéasome grâce à l'ubiquitylation afin d'y être dégradées. L'ubiquitylation se déroule en trois phases successives impliquant 3 types d'enzymes nommées E1, E2 et E3 : **la première étape** consiste en l'activation de l'enzyme E1 via un mécanisme ATP dépendant.

Dans **la deuxième étape**, le résidu ubiquitine activé est transféré sur une protéine d'assemblage E2. Enfin, **la troisième étape** correspond à la phase d'ubiquitylation proprement dite par l'intermédiaire du complexe E2/E3 (voie A et B) ; cette étape va permettre l'adressage de la protéine cible au protéasome grâce à la formation d'une chaîne polyubiquitine. La spécificité vis-à-vis d'un substrat particulier est conférée par l'affinité qu'il a pour la protéine E3. Après la dégradation de la protéine, les résidus ubiquitines sont récupérés pour une autre ubiquitylation (figure 6).

Dans la maladie de Parkinson, des inclusions éosinophiles, filamenteuses et riches en corps de Lewy apparaissent dans le cytoplasme des neurones DA restants.

Dans les rares formes familiales de cette maladie, des mutations des différents composants (parkine et ubiquitine C-terminal hydrolase L1) du système ubiquitine-protéasome (SUP), principale voie biochimique responsable de la dégradation et de l'évacuation des protéines indésirables (CAD protéines mutantes et endommagées), sont responsables du développement de la maladie. De plus, des mutations ou un triplicat du gène de l' α -synucléine, peuvent modifier la conformation et le niveau d'expression de la protéine, et être ainsi responsables du développement d'une forme héréditaire de maladie de Parkinson. Cependant, des incertitudes persistent sur la manière dont l'altération du gène de l' α -synucléine pourrait causer la neurodégénérescence : probablement par la présence en excès de cette protéine qui inhiberait le SUP et conduirait à une agrégation de protéines anormales. Ainsi, des anomalies du fonctionnement de ce système de détoxification de protéines anormales peuvent être à l'origine d'une maladie de Parkinson, probablement par agrégation de protéines anormales et développement d'un stress oxydatif.

1.5.2 Rôle des facteurs de croissances

Les facteurs neurotrophiques jouent un rôle déterminant dans la survie et la différenciation des neurones (Thoenen et Edgar 1985 ; Levi-Montalcini, 1987). Ainsi, un défaut de leur synthèse ou l'absence d'un récepteur spécifique pourrait conduire à la mort par apoptose de certains neurones. Dans ce cadre, deux facteurs essentiels ont été étudiés, le « Brain-derived neurotrophic factor » (BDNF) et le « Glial-derived neurotrophic factor » (GDNF). Toutefois, bien que de nombreuses études aient été menées, aucune ne semble être concluante (Ernfors et coll., 1994 ; Hunot et coll.,

1996 ; Granholm et coll., 1997). En revanche, l'utilisation de ces facteurs neurotrophiques pourrait s'avérer une piste thérapeutique intéressante (Alexi et coll., 2000 ; Moller et coll., 1996 ; Grunblatt et coll., 2000) (chapitre 3.3.1.5)

1.5.3 Rôle du calcium, du glutamate et des phénomènes d'excitotoxicité

L'augmentation des concentrations intracellulaires de calcium libre est toxique pour les cellules (Rothman et coll., 1987) et constitue une des étapes finales dans la cascade des événements conduisant à la mort cellulaire. La présence de protéines capables de fixer le calcium libre telles que la calbindine ou la calrétinine permet de maintenir l'homéostasie calcique et ainsi de jouer un rôle protecteur (Mattson et coll., 1991). Plusieurs études post-mortem sur des cerveaux de patients atteints de la maladie de Parkinson confirment l'hypothèse de l'implication du calcium dans la mort des neurones dopaminergiques (Yamada et coll., 1990 ; Mouatt-Prigent et coll., 1996).

Des phénomènes d'excitotoxicité pourraient participer à la mort des neurones DA (Rodriguez et coll., 1998 ; Beal, 1998 ; Sonsalla et coll., 1998), en particulier via l'activation des récepteurs NMDA (Turski et coll., 1991). Les sources principales de glutamate au niveau de la substance noire sont le noyau subthalamique et le noyau pédonculopontin (Kita et Kitai, 1987 ; Lavoie et Parent, 1994). Le noyau subthalamique présente une hyperactivité après dénervation DA (voir chapitre 1.3.2). Certains auteurs ont suggéré que l'hyperactivité de la projection subthalamo-nigrale pouvait avoir un effet excitotoxique sur les neurones DA (Rodriguez et coll., 1998). Une étude récente a montré que la lésion du noyau subthalamique protégeait les neurones DA contre la toxicité de la 6-OHDA (Benazzouz et coll., 2000). Ces observations ne permettent pas de conclure sur le rôle de ces mécanismes au cours de la maladie de Parkinson ; en revanche, elles peuvent permettre de développer de

nouvelles stratégies thérapeutiques visant à ralentir le processus dégénératif (chapitre 3.3.1).

1.5.4 Rôle du stress oxydatif

La présence de radicaux libres peut avoir un rôle dans la pathogénie de la maladie de Parkinson. Les radicaux libres sont des espèces chimiques, à fort potentiel toxique, produits au cours du métabolisme cellulaire. Quatre arguments principaux font suspecter leur implication dans la pathogénie de la maladie de Parkinson. 1) Tout d'abord les neurones DA sont exposés à de grandes quantités de radicaux libres oxygénés. 2) Le rôle du stress oxydatif a été montré dans d'autres affections neurodégénératives et dans certains syndromes parkinsoniens non idiopathiques. 3) Les neurones mélanisés, potentiellement exposés à des plus fortes quantités de radicaux libres, sont préférentiellement atteints dans la maladie de Parkinson. 4) Chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, il existe des indices de stress oxydatif dans la substance noire. Deux éléments pouvant être générateurs de radicaux libres ont par ailleurs été mis en évidence chez ces patients : un dysfonctionnement mitochondrial et une accumulation de fer dans la substance noire.

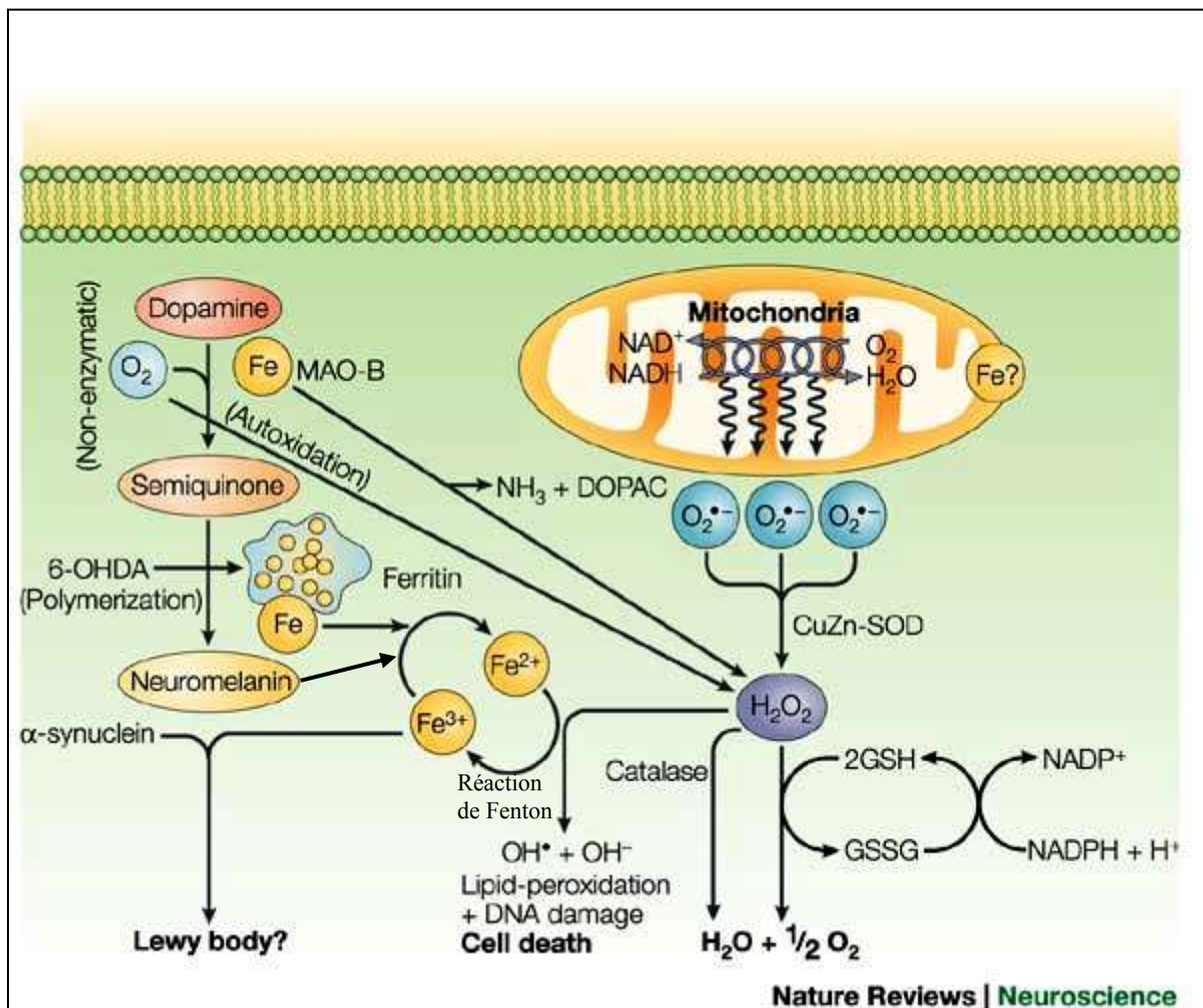


Figure 7 | Hypothèse impliquant le fer et le stress oxydant dans la MP. Ce schéma résume les découvertes pathochimiques dans la MP, et tente d'expliquer les cascades synergiques, impliquant le stress oxydant, pouvant conduire à la mort neuronale. Ce modèle est basé sur les découvertes des études post mortem, qui ont montré une réduction de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire de la mitochondrie ; une baisse de glutathion ; une augmentation des concentrations de fer et une augmentation des marqueurs du stress oxydant dans la substance noire ; une augmentation du « turn-over » de la DA ; des corps de Lewy. Des mécanismes similaires, impliquant un stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène, ont été également décrits dans d'autres maladies neurodégénératives.

D'après Zecca et coll. (2004).

1.5.4.1 Les neurones DA sont exposés à de grandes quantités de radicaux libres

Les neurones DA sont probablement les neurones cérébraux exposés, de façon constitutive, aux plus fortes quantités de radicaux libres. Quatre sources importantes de radicaux libres peuvent être identifiées dans les neurones dopaminergiques.

1) La dégradation de la dopamine se fait selon deux grandes voies : une voie enzymatique et une voie non enzymatique, dite auto-oxydative. Ces deux voies génèrent d'importantes quantités de radicaux libres. La dégradation oxydative utilise en particulier la monoamine oxydase, enzyme produisant du peroxyde d'hydrogène, qui est un précurseur direct de radicaux libres (Spina et Cohen., 1989). La dégradation auto-oxydative conduit à la production de neuromélanine, pigment présent dans de nombreux neurones DA, et produit aussi de grandes quantités de radicaux libres (Graham et coll., 1978) (figure 7).

2) Les neurones DA contiennent d'importantes quantités de mitochondries. La chaîne respiratoire, localisée dans la membrane interne de la mitochondrie, est une source importante de radicaux libres (figure 7).

3) La SNpc est une des régions cérébrales les plus riches en fer (Jellinger et coll., 1990 ; Sofic et coll., 1991). Or le fer favorise grandement la formation de radicaux libres, à partir de peroxyde d'hydrogène par la réaction de Fenton, et en participant aux réactions auto-oxydatives (figure 7).

4) Un grand nombre de neurones DA contient de la neuromélanine. Sa production lors de la dégradation auto-oxydative de la DA génère des radicaux libres. La mélanine possède aussi des propriétés potentiellement génératrices de radicaux libres. Elle a, en effet, une forte affinité pour le fer et les autres métaux (Ben-Shachar

et Youdim., 1990), qui favorisent la formation de radicaux libres. In vitro, elle augmente la capacité des métaux à générer des radicaux libres, en particulier en favorisant la transformation de Fe^{3+} en Fe^{2+} (Swartz et coll., 1992) (figure 7).

1.5.4.2 Rôle étiologique du stress oxydatif dans d'autres affections neurodégénératives et dans d'autres syndromes parkinsoniens

Plusieurs études suggèrent que les radicaux libres peuvent être impliqués dans la survenue de la sclérose latérale amyotrophique (SLA), affection neurodégénérative qui touche uniquement les motoneurones. Une mutation dans le gène de la superoxyde dismutase (SOD), enzyme protectrice contre les radicaux libres, a été mise en évidence dans certaines formes familiales de SLA. (Rosen et coll., 1993). Ceci a été vérifié expérimentalement, puisque la production de peroxyde d'hydrogène et de superoxyde a une toxicité dose-dépendante sur les motoneurones en culture (Michikawa et coll., 1994), et que la production de radical hydroxyle est capable de détruire, in vivo, les motoneurones de rat (Liu et coll., 1994). Ainsi, un mécanisme similaire, mais concernant les neurones dopaminergiques, pourrait être en cause dans la maladie de Parkinson.

Le syndrome sclérose latérale amyotrophique- syndrome parkinsonien- démence de l'île de Guam semble causé par une toxine excitotoxique alimentaire, l'acide alpha-amino-béta-méthylaminopropionique (Spencer et coll., 1986). Or, de nombreux arguments laissent penser que l'excitotoxicité pourrait exercer une action délétère par l'intermédiaire d'un stress oxydatif (Lafon-Cazal et coll., 1993 ; Bondy et Lee, 1993).

Un déficit congénital en vitamine E, puissant anti-oxydant, entraîne entre autres, une dysfonction de la voie nigro-striatale, et probablement une perte des neurones DA (Dexter et coll., 1994a).

Enfin, l'intoxication par le MPTP est responsable chez l'homme et les primates non-humains d'un tableau anatomo-clinique très proche de la maladie de Parkinson (Bloem et coll., 1990). Différents travaux ont permis de comprendre le mécanisme d'action de cette substance, et soulignent le rôle du stress oxydatif dans la destruction des neurones DA.

1.5.4.3 La sous-population des neurones DA la plus exposée au stress oxydatif est la plus affectée dans la maladie de Parkinson

Les lésions DA sont hétérogènes dans le mésencéphale des patients atteints de la maladie de Parkinson. Les neurones DA les plus sévèrement affectés dans cette maladie sont ceux qui sont exposés de façon constitutive aux plus grandes quantités de radicaux libres. Comme nous l'avons dit précédemment, la plupart des neurones DA de la substance noire contiennent de la neuromélanine (Hirsch et coll., 1989), témoin d'une auto-oxydation importante de la DA. De plus, la forte présence de SOD suggère que ces neurones sont exposés à une forte quantité de radicaux libres (Zhang et coll., 1993). Cependant, dans cette même région les mécanismes de défense contre ce stress oxydant sont faibles. En effet, les astrocytes, qui sont les seules cellules à posséder la glutathion peroxydase (GPx) (importante dans la détoxification des radicaux libres), sont particulièrement peu présents dans la SNpc (Damier et coll., 1993). Cette région où un stress oxydant élevé étant plus susceptible d'être présent, est particulièrement atteinte dans la maladie de Parkinson. A l'inverse, dans la substance grise péri aqueducule, les neurones DA ne contiennent pas de neuromélanine (Hirsch et coll., 1988) et possèdent un environnement astrocytaire dense les rendant plus aptes à détoxifier les radicaux libres (Damier et coll., 1993). Cette région, peu exposée au stress oxydatif, est préservée dans la maladie de Parkinson.

Ainsi, les sous-populations de neurones DA les plus exposés au stress oxydatif et les moins bien protégées contre ce stress sont les plus atteintes dans la maladie de Parkinson. Ceci expliquerait la distribution lésionnelle observée dans le mésencéphale au cours de cette maladie.

1.5.4.4 Indices et facteurs de stress oxydatif dans le mésencéphale de patients atteints de la maladie de Parkinson

Différentes études ont montré l'existence d'un stress oxydatif accru dans la substance noire de patient parkinsonien. Ceci a été mis en évidence par l'analyse des taux de malondialdéhyde ou de peroxydes lipidiques, indicateur du niveau de lipoperoxydation, augmentés dans la SNpc de patient atteint de la maladie de Parkinson et témoignant d'une exposition accrue aux radicaux libres (Dexter et coll., 1989a ; Dexter et coll., 1989b ; Dexter et coll., 1994b). De plus, la quantité de glutathion réduit est diminuée dans la substance noire (Perry et coll., 1982 ; Sian et coll., 1994) et cette réduction est corrélée avec la sévérité clinique de la maladie (Riederer et coll., 1989). Ces résultats sont spécifiques de la maladie de Parkinson et ne peuvent pas être dus au traitement par la L-DOPA, puisque les patients atteints d'atrophies multi-systématisées et de paralysie supranucléaire progressive traités aux mêmes doses de L-DOPA, n'ont pas de réduction significative de glutathion peroxydase (Sian et coll., 1994).

En plus d'une augmentation du stress oxydatif dans la substance noire de patients atteints de la maladie de Parkinson, deux autres facteurs potentiellement générateurs de radicaux libres ont été observés dans cette maladie : un dysfonctionnement mitochondrial (déficit du complexe I de la mitochondrie) (Hattori et coll., 1991) et une accumulation de fer (Faucheux et coll., 1995).

Ainsi, de multiples arguments plaident en faveur du rôle du stress oxydatif dans les mécanismes responsables de la destruction des neurones DA dans la maladie de Parkinson. Il est cependant difficile de déterminer si l'augmentation du stress oxydatif est une cause ou une conséquence non spécifique de la perte neuronale. Cependant, la sélectivité lésionnelle des neurones constitutivement les plus exposés au stress oxydatif et la spécificité de l'augmentation de ce stress au niveau de la substance noire des patients atteints de la maladie de Parkinson suggèrent l'implication des radicaux libres dans les mécanismes à l'origine de la mort des neurones DA (pour revue : Fahn et Cohen, 1992).

1.5.5 Mécanismes finaux : l'apoptose

La présence du marquage « *deoxytransferase- mediated dUTP-biotin nick end labeling* » (TUNEL) dans la SNpc de cerveaux de patients parkinsoniens analysés en post mortem suggère que les neurones meurent par apoptose au cours de cette maladie (Mochizuki et coll, 1996 ; Anglade et coll, 1997 ; Tompkins et coll, 1997 ; Tatton et coll, 1998 ; pour revue Burke et Kholodilov, 1998), bien que le marquage TUNEL par lui-même ne prouve pas que l'apoptose se produise. Mochizuki et coll (1996) ont constaté que plus de la moitié de sept échantillons post mortem de cerveaux de parkinsonien étudiés contenaient des noyaux TUNEL-positifs, mais seulement chez les patients à un stade tardif de la maladie, alors qu'aucun marquage n'a été trouvé dans les échantillons provenant de patients à un stade précoce de la maladie. L'analyse de l'ultrastructure des neurones mélanisés de la substance noire des cerveaux de patients en post mortem, par Anglade et coll (1997), a montré qu'un petit pourcentage des neurones était en apoptose alors qu'aucun ne présentait de nécrose. Bien que le pourcentage des neurones en apoptose pourrait être considéré comme faible, la maladie de Parkinson est caractérisée par une

dégénérescence progressive chronique, il est donc normal de ne pas avoir une dégénérescence importante. Tompkins et coll (1997) ont trouvé des noyaux TUNEL-positifs dans les cerveaux normaux et les cerveaux de patients parkinsoniens, avec cependant plus de cellules marquées dans les cerveaux de patients atteints de la maladie de Parkinson. En revanche, Dragunow et coll (1995) et Kosel et coll (1997) n'ont pas trouvé de cellules TUNEL-positives marquées dans la substance noire de patients. Ainsi, il n'est pas encore clairement établi que l'apoptose puisse jouer un rôle significatif dans le processus dégénératif de la substance noire dans la maladie de Parkinson. Cependant, en raison de la nature prolongée de la dégénérescence, sur plusieurs années, l'analyse à un temps donné de la mort neuronale par apoptose est difficile.

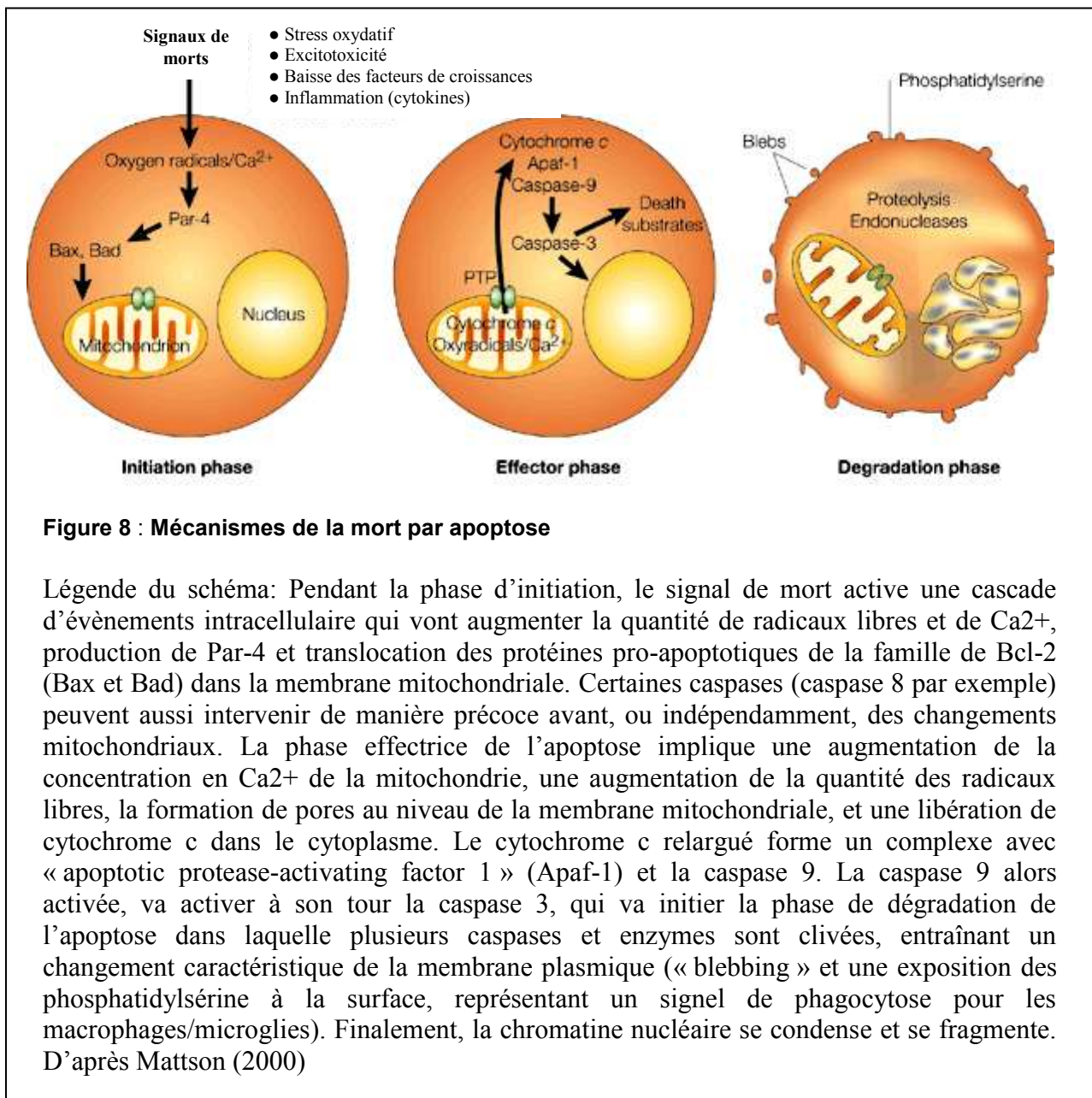
Comme nous l'avons mentionné dans les chapitres précédents, beaucoup de signaux peuvent déclencher l'apoptose des neurones (figure 8):

Le signal le mieux étudié est un déficit en facteur neurotrophique, qui peut déclencher l'apoptose au cours du développement du système nerveux et probablement dans la maladie neurodégénérative (Oppenheim, 1991 ; McKay et coll., 1999). La plupart des neurones du système nerveux central de mammifère possèdent des récepteurs permettant le déclenchement d'apoptose dépendant de la quantité de glutamate : excitotoxicité du glutamate. En effet, la suractivation des récepteurs du glutamate peut induire l'apoptose par un mécanisme impliquant un influx de calcium (Ankarcrona et coll., 1995 ; Glazner et coll., 2000). Un troisième signal de la mort neuronale peut être le stress oxydatif (chapitre 1.5.4), les radicaux libres (tels que l'anion superoxide et le radical hydroxyle) peuvent endommager les lipides cellulaires, les protéines et les acides nucléiques en attaquant les liaisons chimiques de ces molécules (Sastry et Rao, 2000 ; Mattson, 1998). Un autre signal

peut venir des cytokines proinflammatoires ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ et IL1) libérées par la glie activée (cf chapitre suivant 1.5.6), qui peuvent stimuler des récepteurs possédant des domaines de mort et ainsi initier l'apoptose.

Les facteurs qui déclenchent l'apoptose neuronale peuvent être différents, mais les événements biochimiques qui conduisent au processus de la mort cellulaire sont fortement conservés. La mitochondrie a un rôle central dans ces mécanismes (Kroemer et coll., 1998).

Les généralités sur les mécanismes de la mort par apoptose sont présentées dans le schéma suivant (figure : 8):



1.5.6 Rôles contrastés de la glie

1.5.6.1 Les cellule gliales

C'est le pathologiste allemand Rudolf Virchow qui, en 1846, fut l'origine du concept de glie après avoir décrit ce qu'il appelait un *Nervenkitt*, c'est à dire un mastic ou une substance assimilée à de la glue (d'où le terme glie). La glie comprend toutes les cellules du système nerveux central (SNC) autres que les neurones. Ces cellules très ramifiées constituent presque la moitié de la masse totale du SNC qui contient donc peu de matériel extracellulaire. La glie a des relations étroites et essentielles avec les neurones, leur assurant un support mécanique et métabolique. On distingue 3 types principaux de cellules gliales : les oligodendrocytes, les astrocytes et la microglie.

1.5.6.1.1 Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont les cellules gliales les plus nombreuses de la substance blanche. Leur seule fonction reconnue est la myélinisation des neurones dans le SNC; c'est à dire procurer une gaine de protection électrochimique autour de certains axones de la substance blanche, de manière à augmenter la vitesse de propagation des potentiels d'action le long de la fibre. Un seul oligodendrocyte peut être responsable de la myélinisation de plus de 50 fibres nerveuses. C'est cette caractéristique qui les place au centre des maladies démyélinisantes comme la sclérose en plaque (SEP).

Les oligodendrocytes ne semblent pas impliqués dans la maladie de Parkinson, d'autant plus que les neurones DA ne sont pas myélinisés.

1.5.6.1.2 Les astrocytes

Ce sont les méthodes histologiques d'imprégnation qui ont révélé l'existence de cellules gliales en forme d'étoile, d'où leur nom. Ces cellules, qui sont les composants cellulaires les plus représentés dans le cerveau (elles représentent plus de dix fois le nombre de neurones et occupent près d'un tiers du volume du cortex cérébral), ont des prolongements multiples occupant la majeure partie des espaces séparant les neurones, et se terminent par des expansions sur les membranes basales des capillaires, les pieds périvasculaires, qui jouent un rôle déterminant dans l'étanchéité de la barrière hémato-encéphalique (BHE). D'autres prolongements se terminent par apposition étroite sur les régions non synaptiques des neurones. Par ces caractéristiques anatomiques, il a été très vite considéré que les astrocytes avaient un rôle d'intermédiaire dans les échanges métaboliques entre les neurones et le sang. Mais ils sont aussi le support architectural des neurones, jouant un rôle important dans la réparation des lésions, la protection neuronale et pouvant aussi contrôler les mécanismes de l'inflammation dans le SNC.

Les astrocytes forment une population apparemment hétérogène car ils diffèrent d'une région du cerveau à l'autre, tant par leur morphologie que par leur capacité à répondre à l'inflammation (pour revue: Lafont et Prochiantz, 1994). En fait, il est probable qu'il y ait autant de types d'astrocytes qu'il existe de types de neurones puisqu'ils paraissent s'adapter aux compétences neurochimiques et aux variétés morphologiques des neurones qu'ils protègent, et participent également au métabolisme de certains neuromédiateurs. En rapport avec notre modèle d'étude, il est intéressant de noter que les astrocytes du mésencéphale permettent d'induire une arborisation extensive des neurones dopaminergiques, alors que les astrocytes striataux ont un effet limité, induisant une longue et unique extension neuritique (Denis-Donini et coll., 1984).

Il a été décrit que des excès de concentration de glutamate ou de neuropeptides dans l'environnement peuvent accroître la capacité des astrocytes à exprimer des marqueurs immunologiques tels que la molécule du CMH de classe II (Lee et coll., 1992; Frohman et coll., 1988). Cependant, ils sont également capables d'accroître leur production de facteurs neurotrophiques, lesquels assurent la survie et la régénération neuronale. De ce fait, les astrocytes participent plus au maintien d'une homéostasie neuroimmunologique et oxydative qu'au développement de réponses immunes spécifiques.

L'implication des astrocytes dans la maladie de Parkinson

Les astrocytes sont les seules cellules à posséder la glutathion peroxydase (importante dans la détoxification des radicaux libres), leur faible présence dans la SNpc rend cette structure particulièrement sensible au stress oxydatif (Damier et coll., 1993) (voir chapitre 1.5.4). La réaction gliale au sein de la substance noire, chez les patients parkinsoniens, est caractérisée par la présence d'astrocytes activés (Damier et coll., 1993). On en retrouve aussi dans la substance noire de patients intoxiqués au MPTP (Langston et coll., 1999).

1.5.6.1.3 La microglie

Les cellules microgliales sont de petites cellules, relativement peu nombreuses, d'origine mésenchymateuse, ayant migré dans le SNC au cours du développement foetal. Lors de processus inflammatoires, les cellules microgliales, qui forment à l'âge adulte un vaste réseau de défense du tissu nerveux, peuvent se transformer en cellules phagocytaires amiboïdes. Cette idée est née, au début du XXe siècle, des observations de Pio del Rio Hortega, qui constata qu'après lésion du cerveau, certaines cellules ramifiées du SNC pouvaient réagir et reprendre la forme

ronde et immature qu'elles présentent dans le cerveau en cours de développement. Ces cellules ressemblent alors aux macrophages présents hors du SNC, or del Rio Hortega savait que lorsque les macrophages détectent une lésion ou une infection, ils migrent vers les tissus endommagés, prolifèrent et phagocytent les cellules lésées. Selon lui, les changements de morphologie des cellules microgliales matures correspondent à une métamorphose macrophagique et il postula que les cellules microgliales étaient les macrophages du cerveau. Par la suite, l'utilisation d'anticorps monoclonaux permit à l'équipe de Perry de mettre en évidence des éléments en faveur du rôle immunitaire des cellules microgliales (Perry et coll., 1985).

Bien qu'ayant des caractéristiques similaires, les cellules microgliales, qui représentent environ 10% des cellules gliales, n'ont pas la même morphologie dans tout le SNC (Lawson et coll, 1990, 1993), indiquant qu'il peut exister des facteurs locaux influençant cette différenciation. A l'état de repos, la microglie est décrite comme sécrétant des cytokines immunosuppressives comme le Transforming Growth Factor- β 1 (TGF β 1) (Kiefer et coll., 1995). En règle générale, de nombreux marqueurs leucocytaires, et même ceux restreints aux macrophages, ont des degrés d'expression très faibles sur la microglie au repos, reflétant le microenvironnement du CNS (Perry et Gordon, 1987; Streit, 2002). C'est le cas des molécules de CMH, du leukocyte common antigen (LCA), une tyrosine phosphatase aussi connue sous le nom de CD45, autant que du récepteur Fc, du CD11b, ou des marqueurs CD4 (Sedgwick et coll., 1991b ; Streit et coll., 1999). Il apparaît, en fait, qu'une grande partie des marqueurs macrophagiques ne sont pas retrouvés sur la microglie, et à l'inverse, tous les marqueurs de la microglie sont exprimés par les macrophages (Matyszak et coll., 1992). Toutefois, dans les cerveaux âgés, la microglie paraît plus activée: les molécules de classe II, CD11b (CR3), CD45 et CD4 sont plus nettement

déTECTABLES (Perry et coll., 1993). De même, le marqueur ED-1, qui reconnaît spécifiquement un antigène de la membrane lysosomale présent sur tous les macrophages au cours du développement, est absent de la microglie adulte au repos, puis réexprimé dans le cerveau (Sminia et coll., 1987). Ainsi, malgré une origine commune avec les macrophages, les cellules microgliales quiescentes se caractérisent par une perte de leurs marqueurs immunologiques. Cependant lors de leur activation, elles peuvent rétablir une partie de cette expression, migrer, proliférer, phagocyter les débris cellulaires et même participer à la réponse immunitaire adaptative.

L'implication des cellules microgliales dans la maladie de Parkinson

Le rôle de la microglie dans la maladie de Parkinson a été suspecté au regard d'un certain nombre d'observations. Tout d'abord, la densité des cellules microgliales est plus élevée dans la SN que dans les autres régions du cerveau (Lawson et coll., 1990 ; Kim et coll., 2000). De plus, les neurones de la SNpc sont plus susceptibles d'activer la microglie suite à un traumatisme ou à une injection de lipopolysaccharide (LPS) (Kim et coll., 2000) ; ceci conforte l'idée que la gliose peut jouer un rôle particulièrement important dans la maladie de Parkinson.

La voie nigrostriée DA est la voie DA la plus affectée dans la maladie de Parkinson. Les neurones qui forment cette voie ont leurs corps cellulaires dans la SNpc et leur terminaison nerveuse dans le striatum. De plus, la perte dopaminergique observée chez les patients Parkinsoniens en post-mortem est associée à une importante réaction gliale, microgliale et astrocytaire (McGeer et coll., 1988 ; Kohutnicka et coll., 1998 ; Banati et coll., 1998 ; Damier et coll., 1993). Cette réaction gliale est beaucoup plus importante dans la SNpc que dans le striatum (McGeer et coll., 1988). Cette réaction microgliale et astrocytaire est maximale dans

les zones les plus affectées par le processus dégénératif (McGeer PL et coll., 1988 ; Banati et coll., 1998 ; Damier et coll., 1993). L'analyse post-mortem des cerveaux de patients intoxiqués au MPTP montre aussi une réaction gliale très importante, dont l'intensité semble être corrélée avec la perte neuronale (Langston et coll., 1999+). Dans les trois autopsies réalisées, il était observé à la fois des astrocytes activés et de la microglie activée ainsi qu'une neurophagie abondante dans la SNpc.

Ces travaux montrent que la réponse gliale dans la SNpc est à peu près similaire entre les patients atteints de la maladie de Parkinson et ceux ayant été intoxiqués au MPTP bien qu'une activité astrocytaire soit plus importante chez les patients intoxiqués (Langston et coll., 1999). D'un point de vue neuropathologique, l'activation microgliale et spécialement la neurophagie est indicative d'un processus actif conduisant à la mort cellulaire.

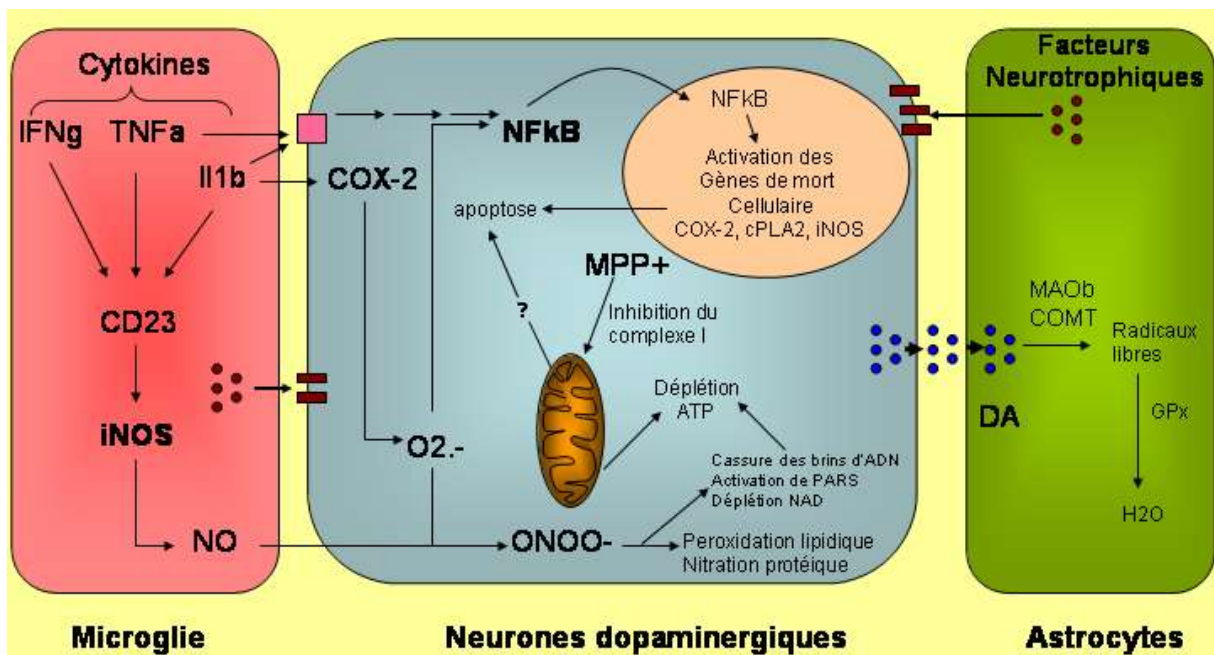


Figure 9 Hypothèses de l'implication des cellules gliales dans la pathogénie de la maladie de Parkinson. La microglie activée peut contribuer à la neurodégénérescence dopaminergique, en libérant des composés cytotoxiques comme les cytokines. Les cytokines peuvent avoir un effet direct sur les neurones dopaminergiques en activant la voie de transduction qui conduit à l'apoptose ou alors en induisant l'expression de COX-2 dans les neurones DA et de iNOS dans les cellules microgliales qui stimule alors respectivement la formation de l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et d'oxyde nitrique (NO). Le NO peut diffuser vers les neurones DA voisins. Si les cellules voisines ont un niveau élevé de $O_2^{\cdot-}$, il existe une probabilité accrue que $O_2^{\cdot-}$ réagisse avec NO pour former du peroxynitrique ($ONOO^-$), qui peut endommager les lipides, les protéines et l'ADN. L'ADN endommagé stimule l'activité Poly(ADP-ribose) synthase (PARS), qui déplete l'ATP déjà affecté par l'inhibition du complexe I par le MPP $^{+}$. Les astrocytes et la microglie peuvent avoir un effet neuroprotecteur sur les neurones DA en produisant des facteurs neurotrophiques, comme le GDNF et le BDNF. De plus, les astrocytes peuvent avoir un effet bénéfique en métabolisant la DA par la monoamine oxydase B (MAOB) ou la catécholo-O-méthyl transférase (COMT), et en éliminant les radicaux libres en utilisant la glutathion peroxidase (GPx). (adapté de Teismann et coll., 2003)

1.5.6.2 L'effet délétère de la glie dans la maladie de Parkinson

Un grand nombre de travaux montre que la glie peut avoir un effet délétère dans la maladie de Parkinson. Dans ce contexte, la cellule qui semble la plus impliquée est la microglie. L'importance de la microglie activée dans les processus dégénératifs découle de plusieurs observations chez le rat (Liu et coll., 2000) :

1) L'injection stéréotaxique de LPS à l'intérieur du SNpc entraîne une forte réaction microgliale à l'intérieur de la SNpc suivie d'une neurodégénérescence des neurones dopaminergiques et 2) l'inhibition pharmacologique de l'activation microgliale empêche la mort neuronale induite par le LPS.

Les cellules microgliales activées peuvent produire une variété de composés toxiques comprenant : les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), les dérivés réactifs de la voie du monoxyde d'azote (NO), les prostaglandines proinflammatoires et les cytokines proinflammatoires. Parmi tous ces composés réactifs, les composés réactifs de la voie du NO pourraient avoir un rôle clef dans la pathogénie de la maladie de Parkinson (Przedborski et coll., 1996 ; Ara et coll., 1998 ; Pennathur et coll., 1999 ; Giasson et coll., 2000 ; Przedborski et coll., 2001). En effet, un grand nombre de cellules gliales exprime des hauts niveaux de « inducible nitric oxyde synthase » (iNOS) dans la SNpc à la fois chez le patient parkinsonien et chez la souris MPTP. (Liberatore et coll., 1999 ; Dehmer et coll., 2000). Ces isoformes de NOS, dès leur induction, produisent des grandes quantités de NO de manière prolongée (Nathan et coll., 1994) ainsi que des radicaux superoxydes (Xia et coll., 1997), deux produits réactifs pouvant induire la mort neuronale.

Les prostaglandines et leurs enzymes de synthèse comme la cyclooxygénase 2 (COX2), constituent un second groupe de molécules pouvant être impliqué dans la neurodégénérescence. En effet, COX2 a un rôle important dans la cytotoxicité et est

fortement liée à l'inflammation (Seibert et coll., 1995 ; O'Banion., 1999). Dans un cerveau normal, COX2 est uniquement exprimée dans certaines régions du cerveau qui sont principalement glutamatergiques (Kaufmann et coll., 1996). Cependant, dans des conditions pathologiques associées à un processus inflammatoire, l'expression de COX2 dans le cerveau augmente significativement, comme le montre l'augmentation de l'un de ses produits (la prostaglandine E2), responsable d'un grand nombre des effets cytotoxiques de l'inflammation. De plus, le promoteur du gène de COX2 est similaire à celui de iNOS (Nathan et coll., 1994) ce qui peut expliquer le fait que ces 2 enzymes soient souvent co-exprimées dans des états pathologiques associés avec une gliose. Ainsi, il n'est pas étonnant de trouver la COX2 et iNOS exprimés dans les cellules gliales de SNpc dans les cerveaux post mortem de patients parkinsoniens ; (Knott et coll., 2000) ; la prostaglandine E2 est aussi exprimée dans les cerveaux de patients (Mattammal et coll., 1995). Des expériences ont par ailleurs montré que l'inhibition pharmacologique de la cyclooxygénase 1 et 2 atténue la toxicité du MPTP chez la souris (Figure 9) (Teismann et coll., 2001).

Les cytokines pro-inflammatoires représentent un troisième groupe de composés dérivés de la glie pouvant avoir un effet délétère dans la maladie de Parkinson. Parmi ces cytokines, le Tumor nécrosis factor alpha ($TNF\alpha$) et l'interleukine 1β ($IL-1\beta$) sont augmentés à la fois dans la SNpc et dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients parkinsoniens (Mogi et coll., 2000 ; Mogi et coll., 1996 ; Mogi et coll., 1994). Des immunohistochimies effectuées en post-mortem ont montré la présence de $TNF\alpha$, d' $IL-1\beta$ et d' $IFN\gamma$ dans les cellules gliales de la SNpc (Hunot et coll., 1999). Ces cytokines peuvent agir à deux niveaux dans la maladie de Parkinson. Premièrement, même si elles sont produites par les cellules gliales, elles

peuvent stimuler les autres cellules gliales et ainsi amplifier et propager la réponse gliale ainsi que son effet délétère. Le $\text{TNF}\alpha$, IL-1 et $\text{IFN}\gamma$ activent les autres cellules microgliales qui vont exprimer l'antigène de surface des macrophages (Hunot et coll., 1999) : $\text{Fc}\epsilon\text{R11}$. L'activation de $\text{Fc}\epsilon\text{R11}$ sur ces cellules microgliales nouvellement activées va induire l'expression de iNOS et la production de NO qui pourra à son tour amplifier la production de cytokines par les cellules gliales ($\text{TNF}\alpha$) et ainsi diffuser aux neurones voisins. Deuxièmement, ces cytokines peuvent aussi agir directement sur les neurones DA en se fixant sur leurs récepteurs spécifiques (récepteurs du $\text{TNF}\alpha$). Une fois activés, ces récepteurs déclenchent une voie de signalisation intracellulaire impliquant la translocation du facteur de transcription $\text{NF}\kappa\text{B}$ à l'intérieur du noyau, aboutissant à une mort cellulaire par apoptose (Figure 9) (Hunot et coll., 1997 ; Vila et coll., 2001 ; Hartmann et coll., 2000).

1.5.6.3 L'effet protecteur des cellules gliales

Les cellules gliales sont aussi susceptibles d'avoir un effet bénéfique, ceci pourrait être le cas dans la maladie de Parkinson et atténuerait la neurodégénérescence. Parmi les différents mécanismes, c'est en particulier la production de facteurs trophiques par la glie qui pourrait avoir ce rôle.

Il est maintenant bien connu que les cellules matures, et encore plus les cellules immatures, y compris les cellules gliales, possèdent des propriétés trophiques qui sont essentielles à la survie des neurones DA. En effet, il a été montré que des astrocytes issus du striatum augmentent de manière très importante la survie et l'expression du phénotype DA sur des cellules en culture issues du mésencéphale ventral (Sortwell et coll., 2000). Bien que l'identité de ces facteurs neurotrophiques reste encore mal connue, certains ont déjà été bien caractérisés. Parmi ceux-là, le « Glial-derived neurotrophic factor » (GDNF) qui peut être libéré par

la microglie activée (Batchelor et coll., 1999), (mais aussi par les astrocytes [McNaught et Jenner, 2000]) semble être le facteur le plus « efficace » sur les neurones DA de la SNpc, lors de la mort cellulaire par apoptose pendant le développement. Ceci a été mis en évidence sur des cultures de mésencéphales ventraux de rats en période postnatale (Burke et coll., 1998). Le GDNF est également capable d'induire le bourgeonnement de terminaisons dopaminergiques dans le striatum ayant subi un traumatisme (Batchelor et coll., 1999). Cet effet est d'ailleurs fortement atténué lorsque l'expression de GDNF est inhibée par des oligonucléotides antisens (Batchelor et coll., 2000). De plus, le GDNF administré par injection soit de la protéine recombinante, soit d'un vecteur viral diminue la mort des neurones dopaminergiques et stimule la fonction dopaminergique à la fois sur des souris et des singes intoxiqués au MPTP (Gash et coll., 1996 ; Kordower+ et coll., 2000 ; Eberhardt O., et coll 2000). Les essais effectués chez l'homme n'ont pas été très convaincants ; les injections intraventriculaires répétées de GDNF recombinant sur un patient à un stade avancé ont été mal tolérées et n'ont pas arrêté la progression de la maladie (Kordower et coll., 1999). Les infusions intra-striatales ont donné des résultats encourageants chez 5 patients (Gill et coll., 2003) qui n'ont pas été confirmés dans une étude plus large (Nutt et coll., 2003)

Le Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) est un autre facteur neurotrophique qui peut être libéré par la microglie activée (mais aussi par les astrocytes [McNaught et Jenner, 2000]) pouvant permettre la survie et le développement des structures dopaminergiques dans le striatum (Batchelor et coll., 1999). Son efficacité comme facteur neuroprotecteur a été confirmée sur certains modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson (Frim et coll., 1994 ; Levivier et coll., 1995) mais l'efficacité chez l'homme reste encore à être démontrée.

Les cellules gliales (astrocytaires) peuvent aussi protéger les neurones DA contre la dégénérescence en éliminant les composés toxiques libérés par les neurones mourants. Par exemple, la dopamine peut produire différents DRO par différentes voies. Ainsi, les cellules gliales peuvent protéger les neurones DA restants contre le stress oxydant résiduel en métabolisant la dopamine via le MAOB et la COMT présents dans les astrocytes et en détoxifiant les DRO par l'intermédiaire de la glutathion peroxydase présente essentiellement dans les cellules astrocytaires (figure 9) (Hirsch et coll., 1999). Les astrocytes peuvent également recapter le glutamate extracellulaire, pouvant ainsi limiter l'effet excitotoxique de l'afférence subthalamique sur la SN (Benazzouz et coll., 2000).

Ainsi, en prenant en considération toutes ces données, la glie peut avoir un rôle neuroprotecteur dans la maladie de Parkinson.

1.5.6.4 Conclusion

Bien que la glie puisse avoir à la fois un effet bénéfique et délétère sur la survie cellulaire, les données de la littérature indiquent que la glie aurait plutôt un effet délétère (pour revue : Michel et coll., 2002 ; Teismann P et coll., 2003).

Cependant le rôle précis de la glie dans les processus dégénératifs est encore mal connu. Il reste à savoir si la réaction gliale est une cause ou une conséquence de la maladie de Parkinson.

2 Les modèles actuels de la maladie

Afin de mieux comprendre les causes et les conséquences de la maladie, l'utilisation de modèles animaux est indispensable. L'absence de « maladie de Parkinson animale spontanée » nécessite l'utilisation de modèles d'étude

« artificiels ». La maladie de Parkinson pouvant se résumer, de façon schématique, en l'expression clinique de la destruction de la voie dopaminergique nigrostriatale, des modèles animaux ont été obtenus, soit par chirurgie soit par traitement.

Ces modèles ont été utilisés pour mieux comprendre la physiopathologie de la maladie et pour tester de nouvelles thérapies (pour revue, Feger et coll., 2002).

2.1 Intérêts des modèles animaux

Pour schématiser, les études sur la maladie de Parkinson concernent : les causes de la maladie, les mécanismes de la mort neuronale et les conséquences du processus dégénératif et, enfin, la mise au point de nouveaux traitements.

Etude des mécanismes de la mort neuronale

De tels modèles ne sont pas évidents à trouver étant donné les incertitudes sur la cause de la maladie de Parkinson et les mécanismes de la mort neuronale. Les plus satisfaisants sont les modèles génétiques, ils consistent à introduire, chez l'animal, le gène avec une des mutations observées dans les formes génétiques humaines. L'introduction du gène peut se faire soit par transgénèse (Wilder et Rizzino, 1993), soit par translocation nucléaire. Ils permettent de mieux comprendre la cause et la manière dont la mutation de ces gènes entraîne la destruction des neurones dopaminergiques de la SNpc. Reste à savoir si les mécanismes observés sont identiques ou non dans les formes de la maladie dont l'origine n'est pas secondaire à ces mutations, comme c'est le cas pour 90% des formes idiopathiques. Les modèles toxiques, peuvent être utiles, ils consistent en l'administration locale ou systémique d'un toxique relativement sélectif des neurones dopaminergiques.

Le processus dégénératif doit être progressif et doit mettre en évidence des stigmates neuropathologiques identiques à ceux observés chez l'Homme.

De nombreux évènements de la cascade conduisant à la mort neuronale après injection de certains toxiques (6-OHDA, MPTP, roténone) ont ainsi été retrouvés chez l'homme (comme l'activation de certaines caspases, la translocation de facteurs de transcriptions ...) dont certaines sont communes ou proches.

Etudes physiopathologiques et évaluation thérapeutique

Un bon modèle doit répondre à certains critères. Tout d'abord, le système dopaminergique et celui des ganglions de la base de l'animal utilisé doivent être les plus proches possibles de ceux de l'homme. Le modèle ne doit pas posséder d'altérations du système dopaminergique au cours du développement mais avoir une perte dopaminergique progressive et lente à l'âge adulte (Beal et coll., 2001). Dans le cas de la physiopathologie et du développement de nouveaux traitements, un modèle stable et aigu peu néanmoins être satisfaisant et présenter l'avantage d'une moins grande variabilité. D'un point de vue clinique, le modèle doit présenter une symptomatologie motrice la plus proche possible de la forme humaine, et en particulier une symptomatologie motrice ou comportementale réversible sous le traitement de référence qu'est la L-DOPA. Ce traitement doit entraîner la survenue des MAIs (Mouvements anormaux involontaires), dyskinésies, tels qu'ils sont observés chez les patients. Ces comportements doivent être facilement quantifiables en utilisant des tests appropriés. Sur le plan histologique, ces animaux doivent avoir une perte dopaminergique de plus de 50% (lorsque les symptômes moteurs sont présents), bilatérale, avec une topographie lésionnelle ressemblant à celle de l'homme. Enfin, le modèle choisi doit être reproductible.

Aucun modèle n'est « parfait » mais chacun présente des avantages et des inconvénients. Il s'agira donc de choisir selon les études le modèle le mieux adapté.

2.2 Les différentes espèces animales utilisées

Différents animaux peuvent être utilisés pour réaliser des modèles de la maladie de Parkinson, aucun n'est parfait, mais chacun peut apporter des informations complémentaires :

La drosophile est utilisée plus particulièrement pour étudier les mutations pouvant être à l'origine de la maladie (Feany et coll., 2000). Sa facilité de stockage et sa reproduction rapide permettent de travailler sur des milliers d'animaux en même temps et de « screener » un grand nombre de gènes. Cependant, même si ce modèle apporte des données très intéressantes, il reste trop éloigné de l'Homme.

La souris est un animal de laboratoire facile à stocker, peu cher, dont la neuroanatomie présente des similitudes avec celle de l'Homme. De plus, il est possible d'obtenir des animaux pratiquement identiques sur le plan génétique. On peut bénéficier plus facilement avec cet animal de modèles transgéniques permettant de comprendre le rôle de certains gènes. Cependant les études comportementales et la chirurgie stéréotaxiques sont plus difficiles à réaliser que chez les animaux de plus grande taille.

Le rat présente les mêmes qualités que la souris exceptée la facilité d'effectuer de la transgénèse. Cependant, les études comportementales et la chirurgie stéréotaxique sont beaucoup plus facilement réalisables.

Enfin, le singe représente le modèle le plus appliqué, étant le modèle ultime de la recherche préclinique car se rapprochant le plus de l'Homme. Son coût, la difficulté de stockage, et les problèmes éthiques rendent son utilisation limitée.

Selon la problématique posée, le choix du modèle animal pourra être différent.

2.3 Les différents modèles

2.3.1 Les modèles génétiques : la souris porteuse d'une mutation sur le gène de l' α -synucléine

Comme nous l'avons mentionné précédemment, il existe des formes génétiques de la maladie de Parkinson. Parmi les gènes identifiés, le gène de l' α -synucléine a fait l'objet d'un grand nombre d'études. La réalisation de souris transgéniques porteuses de cette mutation dans le gène de l' α -synucléine a permis d'obtenir un modèle de la maladie de Parkinson. (Abeliovich et coll., 2000).

Les souris knock-out (KO) pour le gène de l' α -synucléine ne présentent pas de phénotype particulier (Abeliovich et coll., 2000). Ceci suggère qu'une perte de fonction de l' α -synucléine n'est pas la cause de la maladie, et ce, d'autant plus que Dauer et coll (2002) ont montré que les neurones dopaminergiques de ces souris KO étaient résistants aux effets du MPTP, du fait de l'incapacité du MPP+ à inhiber le complexe I de la mitochondrie en l'absence d' α -synucléine. Les mutations à l'origine de la maladie sont plutôt de type « gain de fonction » comme l'a montré une étude sur la drosophile qui présentait des pertes des neurones DA à un âge avancé, des corps de Lewy et des anomalies motrices (Feany et coll., 2000). Les études prometteuses sur la drosophile ont été moins fructueuses chez la souris. En effet, des souris transgéniques ont été créées par la surexpression du gène sauvage de l' α -synucléine (Masliah et coll., 2000). Ces animaux développent des inclusions immunoréactives pour l' α -synucléine qui diffèrent des corps de Lewy. Aucune perte dopaminergique n'a été décelée malgré une légère diminution de la densité des terminaisons dopaminergiques intra-striatales. Ces souris possèdent de légers déficits moteurs mais la réversibilité de ce déficit sous traitement dopaminergique n'a pas été testée.

Les souris sur exprimant l' α -synucléine mutée humaine présentent également des déficits moteurs; des inclusions similaires aux corps de Lewy sont présents dans de nombreuses régions du cerveau (Giasson et coll., 2002 ; Lee MK et coll., 2002 ; Matsuoka Y et coll., 2001 ;van der Putten et coll., 2000 ; Steece-collier K et coll., 2002).

Avantages

Ces animaux ont des inclusions intracytoplasmiques similaires aux corps de Lewy (dans le cas de l'utilisation du gène muté humain) et présentent des déficits moteurs légers. Ils représentent un outil de choix pour étudier l'étiologie de la maladie de Parkinson.

Inconvénients

Ces souris possèdent des stigmates de la maladie de Parkinson mais n'ont pratiquement pas de perte neuronale ; elles permettent ainsi de mieux comprendre la physiopathologie mais ne constituent pas encore de bons modèles de la maladie.

2.3.2 Les modèles par injection d'un toxique

2.3.2.1 Le modèle roténone

Modèle de rat

C'est l'un des modèles de rat les plus récents. Il utilise la roténone, insecticide « organique », qui est un inhibiteur spécifique du complexe I de la mitochondrie, comme le MPTP. Cependant, contrairement au MPTP, la roténone n'est pas sélective pour les neurones DA, car elle n'utilise pas le transporteur à DA pour s'accumuler dans les neurones.

Avantages

La destruction des neurones dopaminergiques de la SNpc est obtenue par injection régulière de roténone, grâce à l'installation d'une pompe Alzet (Betarbet et coll., 2000) constituant une approche plus simple que les lésions stéréotaxiques habituellement effectuées chez le rat. Les rats développent une lésion bilatérale progressive des neurones de la voie nigro-striatale couplée à une diminution de l'immunoréactivité à la tyrosine hydroxylase (TH) et au transporteur à la dopamine (TAD). De plus, des inclusions cytoplasmiques ressemblant aux corps de Lewy ont été observées dans les neurones DA de la SNpc. Sur le plan comportemental, les animaux présentent une bradykinésie, une instabilité posturale et de légers tremblements. Tous ces déficits sont améliorés par un traitement à l'apomorphine, agoniste des récepteurs dopaminergiques (cf chapitre 3.1).

Inconvénients

L'atteinte dopaminergique provoque une lésion focale au niveau du striatum, qui ne correspond pas exactement à la dénervation observée chez l'Homme. De plus, les dyskinésies sous L-DOPA n'ont pas été rapportées. Ce modèle pourrait sembler remarquable puisqu'il possède presque toutes les caractéristiques de la maladie humaine. Cependant, il existe une grande variabilité interindividuelle de la susceptibilité à la toxine. Enfin, il semble que depuis la publication des résultats par Betarbet et coll. (2000), peu d'équipes aient réussi à reproduire ce modèle. Une étude menée à Paris dans les mêmes conditions que celle réalisée par Betarbet et coll (2000) montrait que la roténone provoquait des lésions dans de nombreuses autres régions du cerveau (Hirsch, communication personnelle). Une autre équipe a montré que la roténone provoquait des lésions au niveau du striatum et du globus

pallidus, en l'absence de lésions dopaminergiques chez le rat Sprague-Dawley (Ferrante et coll., 1997). De plus, la lésion n'est pas progressive.

La roténone semble être un toxique trop peu spécifique pour pouvoir obtenir un bon modèle de la maladie de Parkinson.

2.3.2.2 Le modèle obtenu par inhibition du protéasome

Dans la forme sporadique de la maladie de Parkinson, il a été montré une anomalie structurale et un déficit fonctionnel du protéasome, avec une accumulation de protéines anormales non dégradées (McNaught et coll., 2002). De plus, il a été prouvé que les corps de Lewy sont formés dans un « agrésome » résultant de l'altération de la fonction du protéasome, et fournissant ainsi un lien étiopathogénique entre les différentes formes familiales et les formes sporadiques de la maladie de Parkinson.

Des données épidémiologiques suggèrent que l'exposition à certaines toxines environnementales pourrait être responsable du développement de la maladie de Parkinson chez des individus ayant un certain profil génétique et/ou un âge avancé. Il est donc raisonnable d'imaginer que des toxines pouvant inhiber le Système Ubiquitine Protéasome (SUP) pourraient être responsables, dans certains cas, de l'apparition de la maladie. Il est à noter que des inhibiteurs du protéasome sont largement répandus dans l'environnement, notamment produits par des bactéries, des champignons, des plantes et les industries chimiques. En effet, la lactacystine et l'époxomicine, qui sont les plus puissants inhibiteurs de protéasome connus, sont naturellement produits par les actinomycètes (*Streptomyces*) retrouvés dans les sols et les habitats aquatiques. Ainsi, l'exposition à certains microorganismes, ou l'ingestion de nourriture ou d'eau contenant un inhibiteur du protéasome, peut représenter une des voies d'entrée de ces composés dans le corps humain.

Modèle de rat

McNaught et coll. (2004) ont vérifié si un inhibiteur naturel ou synthétique du protéasome était capable d'induire une forme sporadique de maladie de Parkinson. Pour ce faire, ils ont utilisé un inhibiteur irréversible, l'époxomicine (Ac(Me)-Ile-Ile-Thr-Leu-EX, un peptide α',β' -epoxykétoné), et un inhibiteur réversible, le PSI (Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leu-al, a peptide aldehyde).

Avantages

L'injection de l'inhibiteur du protéasome constitue une approche plus simple que les lésions stéréotaxiques habituellement effectuées chez le rat, et a l'avantage d'aboutir à un modèle bilatéral. Aucune toxicité systémique, paralysie ou bien mortalité n'ont été observées chez ces rats. Plusieurs semaines après l'arrêt des injections, les animaux développent progressivement des symptômes parkinsoniens avec une akinésie (évaluée par open-field), améliorée par un traitement par l'apomorphine ou par la L-DOPA.

En faveur d'une dégénérescence progressive des terminaisons DA nigro-striées, les images en tomographie à émission de positons (TEP) montrent une diminution de la fixation striatale de ^{11}CFT , un inhibiteur de la recapture DA. Les analyses post-mortem montrent une déplétion et une neurodégénérescence DA au niveau de la SNpc, ainsi qu'une atteinte d'autres structures non DA.

De plus, au niveau de ces sites de neurodégénérescence, des inclusions intracytoplasmiques éosinophiles et filamenteuses, contenant de la α -synucléine/ubiquitine et ressemblant à des corps de Lewy sont présentes dans les neurones restants. Ces changements pathologiques chez les rats avec une inhibition

du protéasome sont accompagnés par une variété d'altérations biochimiques et cellulaires pouvant jouer un rôle dans les processus de neurodégénérescence qui sont : l'accumulation de protéines non dégradées, le stress oxydatif, l'inflammation, l'activité microgliale, et l'activation de l'apoptose. En tenant compte de tout ça, ce modèle de rat récapitule une grande partie des caractéristiques comportementales et pathologiques de la maladie humaine (McNaught et coll., 2004).

Inconvénients

Toutefois, malgré son intérêt potentiel, cette étude n'est pas à l'abri de critiques et des expériences complémentaires seront nécessaires pour valider la pertinence du modèle proposé. En effet, la perte des neurones DA dans la substance noire n'est pas bien quantifiée, et ne paraît pas respecter la topographie lésionnelle de la maladie (postéro-latérale), mais correspond plutôt à une perte diffuse sur toute la structure, y compris l'ATV. L'analyse comportementale mériterait également d'être affinée avec d'autres tests afin de mieux caractériser les réponses motrices de ces rats. De plus, la lésion n'est pas progressive. Enfin, il est à noter que ces animaux ne développent pas de dyskinésies sous traitement par la L-DOPA.

Cependant, il est important de souligner que cette étude suggère que, comme dans les formes familiales de la maladie de Parkinson, un dysfonctionnement du SUP pourrait jouer un rôle important au niveau de l'accumulation de protéines, la formation de corps de Lewy et la neurodégénérescence dans les formes sporadiques de la maladie de Parkinson. De plus, elle montre que l'exposition à des inhibiteurs du protéasome de l'environnement pourrait être responsable du dysfonctionnement du SUP dans certains cas sporadiques de la maladie de Parkinson.

2.3.2.3 Les modèles MPTP

L'origine de l'élaboration du modèle MPTP est venue de l'observation, en Californie, de syndromes extrapyramidaux sévères chez des toxicomanes qui fabriquaient eux-mêmes l'agent hallucinogène qu'ils utilisaient. L'analyse de ces cas a permis l'identification du toxique responsable, le MPTP (Davis et coll., 1979 ; Langston et coll., 1983). La proximité de ce syndrome clinique et neuropathologique avec la maladie de Parkinson a amené les chercheurs à développer un modèle utilisant cette toxine chez le singe (Kolata., 1983) et la souris. Cependant cette toxine n'a pas d'effet sur le rat (Sahgal et coll., 1984). En fait, c'est l'ion MPP⁺ (produit de dégradation du MPTP par la monoamine oxydase B (MAO_B) qui exerce l'effet toxique ; il est capté par les sites de recapture de la DA, et détruit les neurones en inhibant l'activité du complexe I de la mitochondrie (figure 10, pour revue Przedboski et coll., 2004).

MPTP chez la souris

Avantages

Le modèle de souris MPTP, comme la plupart des modèles obtenus par injection systémique de toxique, est facile d'utilisation et présente des lésions bilatérales de la substance noire. Les animaux ainsi intoxiqués présentent la majorité des symptômes de la maladie de Parkinson qui peuvent être mis en évidence par toute une batterie de tests comportementaux (Sedelis et coll., 2001). Le traitement par la L-DOPA améliore la symptomatologie.

Inconvénients

Par contre les dyskinésies sous traitements par la L-DOPA n'ont pas clairement été décrites chez ces souris. La taille de l'animal limite les analyses comportementales et les études utilisant la stéréotaxie. De plus, la lésion n'est pas progressive et il n'y a pas de présence de corps de Lewy.

Ce modèle est un bon modèle de la maladie de Parkinson, mais pour des études comportementales plus fines et des approches stéréotaxiques, on préférera utiliser le rat. Ce modèle est très utilisé pour étudier l'étiologie de la maladie et les mécanismes inflammatoires (Vila et coll., 2001 ; Liberatore et coll., 1999)

MPTP chez le rat

Le rat a la particularité, contrairement aux souris et aux singes, de posséder de grandes quantités de MAO_B au niveau de ses vaisseaux périphériques ; ainsi le MPP⁺ formé est dégradé avant de traverser la BHE. C'est pourquoi, l'injection systémique de MPTP ne donne pas de lésion DA chez le rat. Une des possibilités est d'injecter directement le MPTP dans la voie dopaminergique nigrostriatale (Bellissimo et coll., 2004 ; Da Cunha et coll., 2001 ; Da Cunha et coll., 2003 ; Braga et coll., 2005).

Avantages

Il constitue un modèle pour étudier les troubles cognitifs (Bellissimo et coll., 2004 ; Da Cunha et coll., 2001 ; Da Cunha et coll., 2003 ; Braga et coll., 2005) et présente une lésion partielle de la SN et du striatum.

Inconvénients

Ce modèle ne présente pas d'altérations motrices importantes. Les MAIs (ou dyskinésies) n'ont pas été mis en évidence sous traitement par la L-DOPA. De plus, l'utilisation de cette toxine est moins pratique que chez les autres animaux (souris, primates), puisqu'elle nécessite d'effectuer des injections stéréotaxiques dans la voie dopaminergique de manière unilatérale (Bellissimo et coll., 2004) ou bilatérale (Braga et coll., 2005), en fonction du modèle étudié. Comme pour les autres modèles la lésion n'est pas progressive et il n'y a pas de présence de corps de Lewy.

MPTP chez le primate

Avantages

La toxicité du MPTP chez le primate présente plusieurs avantages; en premier lieu, il reproduit des signes cliniques de la maladie de Parkinson, incluant la rigidité, l'akinésie, l'instabilité posturale (Burns et coll., 1983 ; Bloem et coll., 1990) et parfois le tremblement (Bergman et coll., 1998 ; Raz et coll 2000). Ce modèle a permis d'étudier les modifications fonctionnelles au sein des ganglions de la base et a contribué à une meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie de Parkinson. Les primates intoxiqués au MPTP répondent bien au traitement par les agonistes dopaminergiques et par la L-DOPA. Ce dernier est d'ailleurs capable d'induire des dyskinésies chez certains de ces primates (pour revue Langston et coll., 2000), qui sont quantifiées en utilisant une échelle d'évaluation humaine (Boyce et coll., 1990 ; Gomez-Mancilla et Bedard. 1993 ; Schneider. 1989 ; Brotchie et Fox. 1999). Ces dyskinésies correspondent aux dyskinésies de pic de dose qui sont observées chez les patients (Nutt. 1990) et, comme chez l'humain, ces dyskinésies perturbent l'activité motrice physiologique de ces animaux.

Comme dans la maladie, les neurones DA de la SNpc sont particulièrement vulnérables surtout dans le tiers ventro-latéral de la structure qui projette sur la partie motrice du striatum (Parent et Lavoie 1993) tandis que les neurones dopaminergiques de l'ATV sont plus résistants à l'intoxication (Parent et Lavoie 1993).

Le modèle primate obtenu par une intoxication au MPTP semble donc être un bon modèle pour étudier les conséquences physiopathologiques de la dénervation nigrostriatale. Il constitue également un outil idéal pour les études précliniques étant donné la proximité anatomo-fonctionnelle entre les primates non-humains et l'Homme.

Inconvénients

Tout d'abord le modèle de singe présente des inconvénients matériels, problème du coût et l'impossibilité de travailler sur des grandes séries. Un des problèmes majeurs de ce modèle réside dans le caractère aigu ou subaigu de l'intoxication. Ainsi, des modèles plus progressifs sur plusieurs semaines ont été mis au point pour mimer le processus dégénératif (Bezard communication). Généralement, on n'observe pas de corps de Lewy chez les singes intoxiqués au MPTP sauf chez certains singes âgés chez lesquels des inclusions neuronales ont été décrites (Forno, 1986), mais avec des caractéristiques ultrastructurales différentes de celles des corps de Lewy (Forno et coll., 1988).

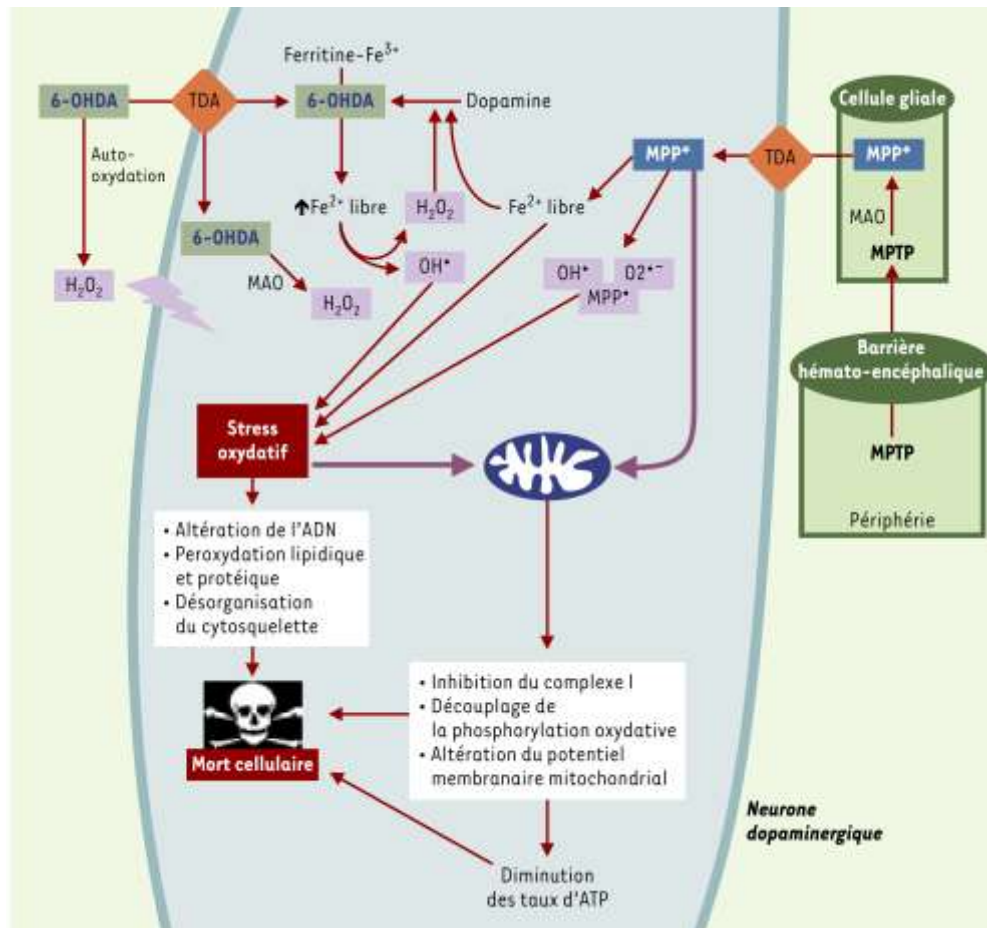


Figure 10 : Les mécanismes impliqués dans la toxicité de la 6-OHDA et du MPTP

L'accumulation de 6-OHDA dans les neurones dopaminergiques, à la suite d'une injection intra-cérébrale ou d'une synthèse endogène mettant en jeu la dopamine et le fer, conduit à : des modifications mitochondriales qui concourent à la diminution des taux d'ATP; la formation d'espèces radicalaires très réactives qui endommagent les macromolécules et participent à la désorganisation de la structure cellulaire. Ces événements conjugués conduisent à la mort des neurones. Une oxydation de la 6-OHDA peut également avoir lieu à l'extérieur de la cellule, produisant alors du peroxyde d'hydrogène qui diffuse dans la cellule et concourt à l'augmentation des taux de radicaux libres intra-cellulaires. Le MPTP est transformé en son métabolite actif, le MPP $^+$, par la monoamine oxydase (MAO) de type B présente dans les cellules gliales. Relargué par celles-ci, il est capté par les neurones dopaminergiques, comme la 6-OHDA, et il va inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, augmenter la synthèse de radicaux libres et provoquer la mort cellulaire. La diminution d'ATP, à la suite du dysfonctionnement mitochondrial, est également responsable d'une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, liée à un phénomène d'excitotoxicité indirecte, qui accélère le processus de dégénérescence. D'après Lambeng et coll., 2002 (med sciences).

2.3.2.4 Les modèles de rats 6 OHDA

Le modèle de rat 6-OHDA obtenu par lésion unilatérale de la voie dopaminergique nigro-striatale est le premier modèle animal de la maladie (Ungerstedt, 1968 ; Ungerstedt et Arbuthnott, 1970 ; Mendez et Finn., 1975) et aussi le plus largement utilisé. Il a contribué à l'étude et à la compréhension de l'anatomie, de la neurochimie et de l'électrophysiologie des neurones dopaminergiques du mésencéphale et de leur zone de projection au sein des ganglions de la base.

Parmi les modèles animaux (rat, souris, singe), le rat constitue un modèle de choix pour plusieurs raisons :

- La taille du rat est optimale (assez grande pour faire de la stéréotaxie avec précision, et suffisamment petite pour faciliter le stockage).
- Son génome est bien caractérisé, ce qui permet d'utiliser tous les outils de la biologie moléculaire (PCR, puces à ADN...)
- Il est possible d'utiliser des animaux pratiquement identiques c'est à dire de même poids, de même âge et surtout génétiquement semblables, permettant ainsi d'avoir des résultats reproductibles.
- La neuroanatomie du rat est également bien caractérisée et présente des similitudes avec celle de l'homme.

2.3.2.4.1 La toxicité de la 6-OHDA

La 6-OHDA est, comme son nom l'indique, une forme hydroxylée de la dopamine. Ses propriétés neurotoxiques furent d'abord révélées au niveau du système nerveux périphérique (Thoenen et Trauzer, 1968). L'injection systémique de 6-OHDA entraîne la dégénérescence des terminaisons catécholaminergiques (noradrénergiques) du système nerveux sympathique. Les injections systémiques

sont sans effet sur le système nerveux central en raison de l'imperméabilité de la BHE pour la 6-OHDA. Les premières études de la toxicité de la 6-OHDA au niveau central ont été réalisées par injection intraventriculaire (Ungerstedt, 1968; Blum et coll., 2001). Ces injections entraînent une déplétion sévère du système nerveux central en catécholamines. La 6-OHDA a permis la réalisation de modèle de dénervation dopaminergique en étant injectée directement dans le striatum, la substance noire ou le faisceau médian du télencéphale (FMT) (Schwartz et Huston, 1996a; Tolwani et coll., 1999; Blum et coll., 2001).

La spécificité de la 6-OHDA pour les systèmes catécholaminergiques s'explique par sa structure. Très proche de la dopamine ou de la noradrénaline, la 6-OHDA est spécifiquement captée par les transporteurs des catécholamines (Blum et coll., 2001). Le co-traitement des animaux avec des inhibiteurs des transporteurs des catécholamines réduit fortement l'effet délétère de la toxine. Afin de cibler spécifiquement les neurones dopaminergiques, la recapture de la 6-OHDA par les neurones noradrénergiques est bloquée par injection de désipramine, inhibiteur des transporteurs des catécholamines, qui a une plus grande affinité pour les systèmes noradrénergiques (Blum et coll., 2001). Enfin, une prolongation de l'action de la 6-OHDA est obtenue par l'administration d'un inhibiteur des monoamines oxydases (la pargyline). Cependant, ces composés provoquent un grand nombre d'effets secondaires chez l'homme (hallucinations, troubles psychiques, excitation psychomotrice...) et pourraient modifier la plasticité cérébrale dans ce modèle expérimental. Les mécanismes de toxicité de la 6-OHDA sont médiés par l'induction d'un stress oxydatif via la génèse de composés réactifs de l'oxygène et par l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale (Blum et coll., 2001) (figure 10). Ce stress est à l'origine de nombreuses altérations structurales et fonctionnelles des

protéines, des lipides membranaires, des acides nucléiques et du fonctionnement mitochondriale. Le modèle d'intoxication à la 6-OHDA est un modèle intéressant puisque le stress oxydatif et les anomalies du fonctionnement mitochondriale sont deux phénomènes impliqués dans les processus dégénératifs de la maladie de Parkinson. (cf chapitre I 5.4).

La 6-OHDA est un composé neurotoxique capable d'induire la lésion des systèmes catécholaminergiques cérébraux (Gerlach et Riederer, 1996 ; Glinka et coll., 1997). In vivo, la 6-OHDA doit être administrée directement dans le tissu cérébral au site ciblé car elle est incapable de passer la barrière hématoencéphalique. Une injection stéréotaxique unilatérale ou bilatérale (en fonction des modèles) de 6-OHDA dans la voie nigro-striée (SN, FMT et Striatum) induit une perte plus ou moins massive des cellules DA nigrales et donc une diminution des taux de dopamine striatale.

Ce modèle a permis de mettre en évidence des mouvements anormaux chez l'animal lésé. En effet, un traitement aigu par injection d'amphétamines, qui permet un relargage de DA dans la fente synaptique, induit un comportement rotatoire unilatéral marqué qui peut être quantifié de façon simple à l'aide d'un « rotomètre » (figure 11).

2.3.2.4.2 Critique des modèles de rats 6 OHDA actuels

Il existe plusieurs modèles de rats traités par la 6 OHDA qui diffèrent les uns des autres, d'un point de vue comportemental et histologique.

2.3.2.4.2.1 Le modèle classique

Lésion totale par injection de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale

Avantages

Le modèle 6-OHDA le plus utilisé pour étudier la maladie de Parkinson est le modèle unilatéral obtenu par injection d'une dose importante de la toxine dans le FMT (Heikkila et coll., 1989). Ces lésions sont pratiquement totales et très peu de neurones DA de la SNpc survivent. Ce modèle est un bon modèle pour l'étude des stades avancés de la maladie de Parkinson.

Inconvénients

D'un autre côté, le désavantage de ce modèle est que, en plus de la destruction des neurones DA du groupe A9 (de la SNpc), les neurones DA du groupe A10 projetant vers le noyau accumbens (partie ventral du striatum) sont aussi atteints. En plus de ce modèle de lésion unilatérale, des modèles de lésions bilatérales dans le FMT ont été développés. Ces animaux sont considérés comme non viables, ayant une adipsie et une aphagie les conduisant à la mort (Ungerstedt 1971). Ainsi, la plupart des modèles par injection de 6-OHDA dans le FMT sont unilatéraux, et ont une destruction quasi-totale des neurones DA de la SNpc mais aussi à un moindre degré des neurones DA de l'ATV. Ces lésions sont un peu trop sévères et touchent des régions rarement atteintes dans la maladie de Parkinson humaine, c'est pourquoi des modèles plus sélectifs par injection de doses modérées de 6-OHDA ont été par la suite développés.

2.3.2.4.2.2 Les nouveaux modèles

Lésions partielles

Faisceau médian du télencéphale (FMT)

Par la suite, un modèle par injection de 6-OHDA dans le FMT a été développé, sélectif uniquement pour les neurones DA du groupe A9 (destruction d'environ 100%) (Perese et coll., 1989).

Avantages

Des modèles avec des lésions moins sévères ont été obtenus par injection de faibles doses de 6-OHDA dans le FMT (Barnéoud et coll., 1995). Ces lésions causent une déplétion modérée d'environ 75% des neurones DA, et un faible déficit de pronation de la patte mis en évidence par le test de l'escalier (staircase test). Ce modèle a donc été proposé comme modèle symptomatique précoce de la maladie (Barnéoud et coll., 1995). Des dyskinésies ont été décrites sur ce modèle, plutôt appelées MAIs (Cenci et coll., 1998) (cf chapitre 2.2.2.4.3)

Inconvénient

Il n'y a pas de modèles bilatéraux décrits viables. C'est un modèle aigu de la maladie et non pas progressif. Pas de présence de corps de Lewy.

Substantia nigra pars compacta.

Avantages

L'injection de 6-OHDA dans la SNpc mime bien la topographie de la perte DA de la maladie. Une lésion unilatérale dans la SNpc entraîne une déplétion d'environ 90% des neurones DA de la SNpc (Carman et coll., 1991). Alors que la lésion unilatérale classique dans le FMT détruit plus de 97% de ces neurones (Carman et

coll., 1991), la sévérité de la lésion est considérée comme moins importante dans ce modèle. De plus, la topographie lésionnelle est similaire à celle observée chez l'homme puisqu'elle est majoritairement latérale (German et coll., 1989 ; German et Manaye., 1993 ; Goto et coll., 1989). Enfin, la déplétion DA au niveau du Striatum est aussi plus latérale que médiale (Carman et coll., 1991). Ces rats ayant une lésion DA dans la SNpc de plus de 90% développent un mouvement rotatoire sous traitement à l'apomorphine (figure 11).

Un modèle bilatéral partiel a été développé (Van Oosten, R. V., and A. R. Cools, 1999. communication).

Inconvénients

Une des difficultés du modèle SNpc est la petite taille de la cible. Il est très difficile d'injecter la 6-OHDA dans cette structure sans léser les structures voisines (comme l'ATV). En effet, il a été observé une réduction de 30% des neurones DA de l'ATV chez ces rats (Carman et coll., 1991). Comme le modèle précédent, le processus dégénératif est plutôt aigu alors que chez l'Homme il est progressif. Il n'y a pas de présence de corps de Lewy dans ce modèle.

Le striatum

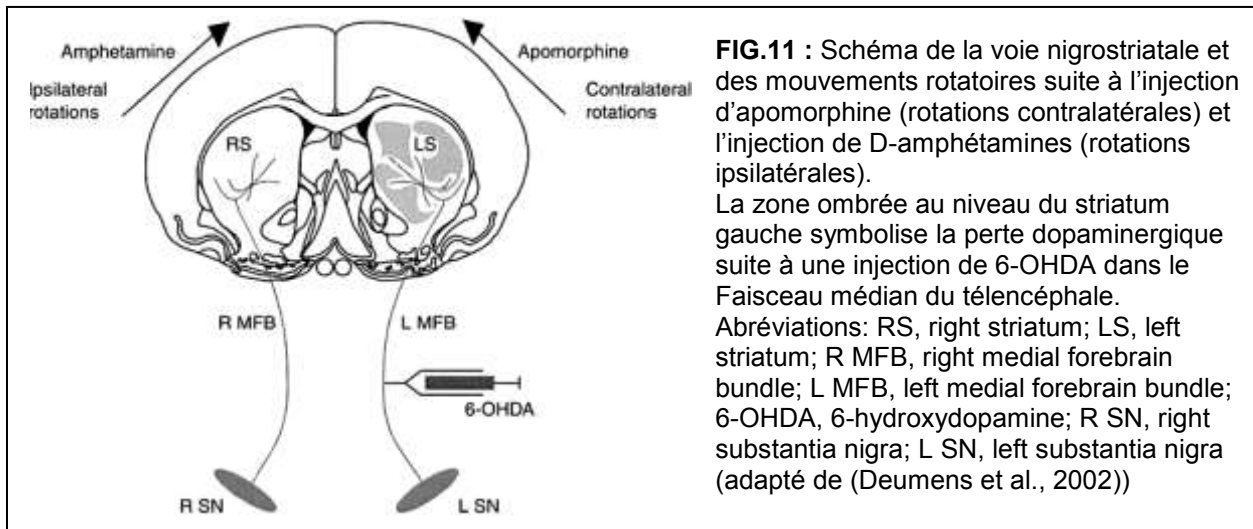
Avantages

La cible est facilement atteignable du fait de sa grande taille, et les données expérimentales montrent, que par certains points, ces modèles se rapprochent assez bien la maladie de Parkinson humaine. Cependant, le striatum est une structure assez grande et il n'y a pas encore de consensus sur le site de lésion. Certaines équipes ont lésé la partie dorsomédiale du striatum (Roedter et coll., 2000) d'autres

ont lésé la partie ventrolatérale du striatum (Lindner et coll., 1999). Le putamen étant la région du striatum qui présente la déplétion la plus importante dans les cerveaux de patients parkinsoniens et correspondant à la partie ventrolatérale du striatum chez le rat (Kirik et coll., 1998), la lésion partielle dans la partie ventrolatérale du striatum semble être, par conséquent, la meilleure cible. Des modèles dans lesquels la partie ventrolatérale du striatum a été lésée de manière bilatérale ont été développés, et miment assez bien la maladie de Parkinson humaine. Ces lésions entraînent une déplétion striatale d'environ 75% et induisent à la fois des déficits moteurs et cognitifs mesurés par le « Retraction task » (Amalric et coll., 1995). Lindner et coll (1999) ont montré que beaucoup de symptômes cliniques pouvaient être observés chez ce rat lésé de manière bilatérale : l'akinésie, la rigidité (adjusting step task), les tremblements (par l'observation des mouvements des mâchoires) et la cognition (piscine de Morris).

Inconvénients

Comme le modèle précédent, le processus dégénératif est plutôt aigu (il met plusieurs mois avant de se stabiliser) alors que chez l'Homme il est encore plus progressif. Il n'y a pas de présence de corps de Lewy dans ce modèle. De plus, les lésions au niveau du striatum peuvent perturber l'analyse histologique de cette structure.



2.3.2.4.3 Aspects comportementaux des lésions à la 6-OHDA

Les déficits comportementaux en réponse à une lésion 6-OHDA peuvent nous donner une indication sur l'importance de la lésion. Dans les modèles unilatéraux, les rotations induites par des drogues peuvent être utilisées comme indicateur de la déplétion DA. L'injection d'apomorphine entraîne des rotations contralatérales à la lésion alors que l'injection d'amphétamines entraîne des rotations ipsilatérales à la lésion (figure 11). On considère qu'une lésion supérieure à 50% des neurones DA de la SNpc, correspondant à une perte de plus de 90% de la densité des fibres DA striatales, est nécessaire pour induire des rotations par injection de faibles doses d'apomorphine (Hudson et coll., 1993). Cependant, les mécanismes à l'origine de ces rotations ne sont pas compris et beaucoup d'expérimentateurs ont critiqué la fiabilité de ces tests comme indicateurs de la perte neuronale DA (Chang et coll., 1999). Des tests comportementaux ont été développés permettant d'analyser les différentes composantes du syndrome parkinsonien (Lindner et coll., 1999) : le test du stepping permettant d'évaluer l'akinésie du membre antérieur, le Rotarod permettant d'analyser l'initiation du mouvement et la piscine

de Morris permettant d'analyser les déficits cognitifs, et le test de l'escalier permettant d'analyser le contrôle fin du mouvement.

En plus de l'évaluation des conséquences motrices de la lésion DA, un des critères importants pour le développement d'un bon modèle est de savoir si ces animaux développent les complications motrices observées chez l'Homme suite au traitement par la L-DOPA, et de pouvoir les quantifier.

Les dyskinésies induites par la L-DOPA chez le rat

Un traitement avec des doses thérapeutiques de L-DOPA chez un rat lésé de manière unilatérale provoque une apparition progressive de mouvements anormaux incontrôlés qui affectent la patte avant controlatérale à la lésion, le tronc et la musculature orofaciale (Lundblad et coll., 2002 ; Cenci et coll., 1998 ; Lee et coll., 2000 ; Andersson et coll., 1999).

Ces mouvements peuvent être quantifiés en se basant sur leurs distributions, leurs amplitudes et leurs durées (Lundblad et coll., 2002 ; Cenci et coll., 1998 ; Lee et coll., 2000 ; Andersson et coll., 1999), en utilisant des critères similaires à ceux utilisés en clinique (Hagell et Widner., 1999). Ces mouvements ont, après une prise de L-DOPA, le même déroulement temporel d'apparition que les dyskinésies de « pic de dose » de la maladie de Parkinson, et comme chez l'humain, ces dyskinésies perturbent l'activité motrice physiologique. Ces dyskinésies observées chez le rat ressemblent à celles observées chez le primate et les observations moléculaires sont similaires aussi à celles étudiées chez le singe. Ces corrélations comprennent une augmentation des ARNm des opioïdes (Cenci et coll., 1998 ; Brotchie et coll., 1998) et du facteur de transcription FosB (Andersson et coll., 1999 ; Doucet et coll., 1996). De plus, l'utilisation de médicaments anti-dyskinétiques comme l'amantadine ou la

clozapine réduisent la sévérité de ces mouvements anormaux involontaires (Metz et Whishaw., 2002), et les médicaments antiparkinsoniens, qui ne provoquent pas de dyskinésies chez l'Homme, n'en provoquent pas non plus chez le rat (Pearce et coll., 1998 ; Metz, et Whishaw., 2002 ; Kanda et coll., 1998).

Ainsi, les rats lésés de manière unilatérale à la 6-OHDA développent des mouvements anormaux involontaires, suite à un traitement par la L-DOPA, qui ressemblent aux dyskinésies observées chez le singe et chez l'homme.

2.4 Conclusion

Malgré ces limites, le modèle de rat lésé à la 6-OHDA possède de nombreux avantages, outre sa facilité d'utilisation et son faible coût. Il présente la majorité des symptômes de la maladie, et peut développer des dyskinésies sous traitement par la L-DOPA (Tableau 1).

Ces modèles sont le plus souvent unilatéraux ; cependant, des modèles bilatéraux, par conséquent plus proches de la maladie humaine, commencent à être développés. La mise au point de modèles bilatéraux développant des dyskinésies sous traitement par la L-DOPA, et présentant presque toutes les caractéristiques de la maladie humaine, serait un outil de choix pour étudier de nouvelles stratégies restauratrices (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques des modèles animaux de la maladie de Parkinson

Modèles	Atteinte du Système DA	Perte progressive des neurones DA	Déficits moteurs détectables facilement	Développement de corps de lewy	Décours temporel court	Effets de la L-DOPA	Viabilité
6-hydroxydopamine							
- Striatum unilatérale	Unilatéral	Oui	Oui	Non	Non (...mois)	MAIs	Oui
- Striatum bilatérale	Bilatéral	Oui	Oui	Non	Non (...mois)	Non publié	Oui
- SN unilatérale	Unilatéral	Non	Oui	Non	Oui	MAIs	Oui
- SN bilatérale	Bilatéral	Non	Oui	Non	Oui	non publié	Oui
- FMT unilatérale	Unilatéral	Non	Oui	Non	Oui	MAIs	Oui
- FMT bilatérale	Bilatéral	Non	Oui	Non	Oui	non publié	Non
		Oui mais il existe des susceptibilités individuelles	Oui	Oui	Oui	Non publié	Oui
Roténone	Bilatéral						
MPTP en aigu (souris)	Bilatéral	Non	Oui	Non	Oui	Non publié	Oui
surexpression de l' α -synucléine	Bilatéral	Oui mais pas dans la SN	Oui	Inclusion nucléaires et cytoplasmique	Non (1 ans)	Non	
Inhibiteur du Protéasome	Bilatéral	Non	Oui	Oui	Oui	Non publié	Oui

Note : MAIs [mouvements anormaux involontaires (voir chapitre 2.2.2.4.3)]

3 Aspects thérapeutiques

3.1 Approche pharmacologique

Le traitement de la maladie de Parkinson a connue une avancée majeure à la fin des années 60 avec la mise en évidence de l'intérêt thérapeutique de la L-DOPA (Cotzias et coll., 1969). Ce traitement symptomatique compense la déficience dopaminergique et améliore grandement la symptomatologie. Il n'est cependant pas dépourvu d'effets indésirables à moyen terme (fluctuations d'efficacités du traitement et dyskinésies). Les agonistes DA se sont ensuite ajoutés à l'arsenal thérapeutique avec l'intérêt de réduire le nombre de ces complications motrices. Le rétablissement de la transmission DA déficiente reste en 2005 la base du traitement de la maladie de Parkinson. A côté, quelques traitements non DA ont été proposés, ayant une action sur les perturbations des fonctionnements des noyaux gris centraux, comme la stimulation cérébrale profonde pouvant être une option thérapeutique efficace dans certaines formes de la maladie.

D'autres traitements sont en cours d'élaboration : la thérapie cellulaire pour remplacer le système DA déficient ou le développement de traitements susceptibles de freiner voire de stopper le processus dégénératif.

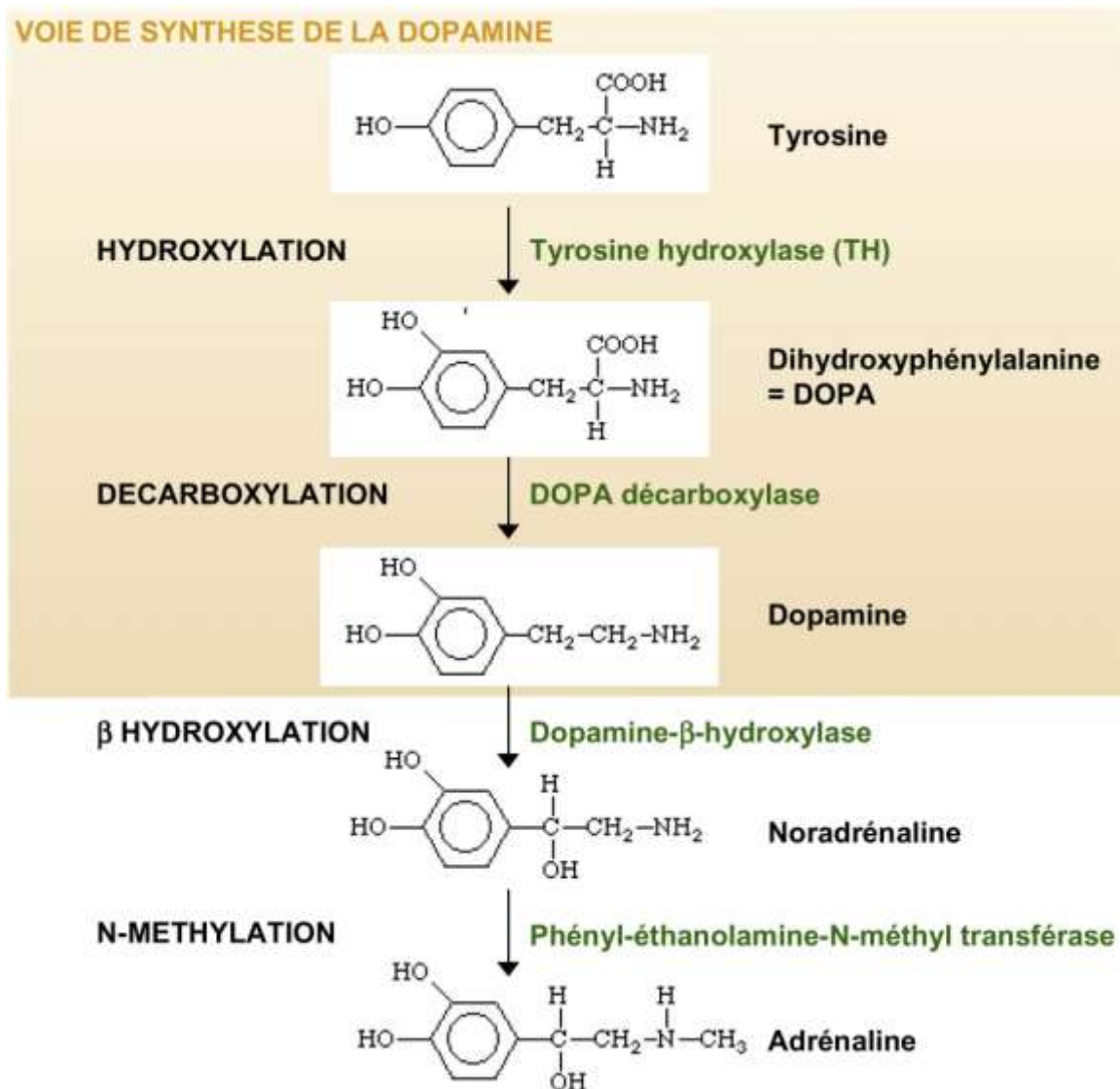


Figure 12 : Voie de synthèse des catécholamines

3.1.1 Les agents dopaminergiques

La perte des neurones dopaminergiques de la SNpc entraîne un déficit en DA striatale à l'origine de dysfonctions importantes au niveau de la circuiterie des noyaux gris centraux. La majorité des traitements médicamenteux vise donc à rétablir la transmission dopaminergique en utilisant deux stratégies principales : 1) rétablir le taux de dopamine par la L-DOPA et agir directement sur les récepteurs à la DA par les agonistes dopaminergiques. 2) De façon complémentaire potentialiser l'effet de la dopamine endogène ou exogène par des inhibiteurs de la dégradation de la dopamine.

3.1.1.1 La L-DOPA

La L-DOPA est réellement devenue le traitement de référence de la maladie de Parkinson, lorsque Cotzias et coll. montrèrent en 1969 qu'une administration orale de L-DOPA avait des effets spectaculaires, à court terme et à long terme sur la symptomatologie parkinsonienne.

La L-DOPA est le traitement le plus logique de la maladie (figure 12), il s'agit du précurseur direct de la dopamine, et contrairement à cette dernière, elle est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique, et permet ainsi aux neurones nigro-striés encore actifs de synthétiser de la dopamine par décarboxylation via la DOPA décarboxylase. En outre, les neurones sérotoninergiques ou les cellules gliales pourraient également capter la L-DOPA et la décarboxyler en dopamine lorsque les neurones dopaminergiques sont en faible nombre (Schwartz et Huston., 1996a). La L-DOPA, administrée par voie orale, peut également être décarboxylée en périphérie et entraîner des nausées, des vomissements et de l'hypertension artérielle. C'est pourquoi la L-DOPA est associée à un inhibiteur de la dopa-

décarboxylase (carbidopa ou bensérazide) qui ne franchit pas la barrière hémato-encéphalique. Ce traitement est généralement très efficace, en particulier pendant les premiers stades de la maladie (période appelée « lune de miel » du traitement). La dopamine stimule tous les récepteurs dopaminergiques, on pourrait donc penser que la L-DOPA constitue le médicament idéal. Or ceci n'est pas tout à fait le cas au niveau pharmacocinétique. En effet, la demi-vie plasmatique de la L-DOPA est courte, de l'ordre de 1,5 à 3 heures (en présence d'un inhibiteur de la dopa-décarboxylase). Ce sont les neurones dopaminergiques survivants qui assurent l'amortissement de cette cinétique, grâce à leur capacité de stockage et de sécrétion endogène de dopamine. Lorsque la perte neuronale devient critique, la seule dopathérapie ne permet plus d'assurer une stimulation dopaminergique stable. L'état moteur du patient tend alors à suivre précisément l'évolution de la concentration plasmatique en L-DOPA, et des troubles moteurs nouveaux apparaissent : fluctuations d'efficacité du traitement CAD réapparition de la symptomatologie parfois de manière brutale, dyskinésies CAD des mouvements anormaux involontaires qui parasitent la motricité des patients. Ces complications apparaissent dans 60% des cas après 5 ans de traitement, et dans 90% des cas après 10 ans de traitement. C'est pourquoi, il est recommandé de prescrire des agonistes dopaminergiques en première intention (conférence de consensus 2000 ; Damier et coll 2000 ; Rascol. 1999, Rascol et coll 2002).

3.1.1.2 Les agonistes dopaminergiques

Les agonistes DA agissent directement sur les récepteurs de la DA, cinq catégories en sont différenciées.

Tous les agonistes dopaminergiques stimulent les récepteurs D2, initialement considérés comme étant seuls impliqués dans les effets moteurs de la dopamine. Ces médicaments sont généralement fortement liposolubles et possèdent donc une durée d'action prolongée mais sont fortement liés aux protéines plasmatiques. A l'inverse de la L-DOPA, leur résorption digestive n'est pas influencée par l'alimentation et leur activité pharmacologique est indépendante du stock de neurones dopaminergiques puisqu'ils agissent directement sur les récepteurs post-synaptiques qui restent, au moins en partie, préservés au cours de la maladie (Playford et Brooks. 1992). On distingue deux classes parmi ces produits. Les plus anciens sont dérivés des alcaloïdes de l'ergot de seigle ou "ergopeptines". Ils possèdent, outre des propriétés agonistes dopaminergiques, des propriétés alpha - adrénergiques ou sérotoninergiques, responsables d'effets indésirables (vasospasme, œdème des membres inférieurs, fibrose pulmonaire ou rétropéritonéale). Les agonistes plus récents sont des composés synthétiques plus spécifiques des récepteurs D2, présentant moins d'effets indésirables. Certains effets indésirables restent cependant communs aux agonistes dopaminergiques et à la L-DOPA, en particulier les effets psychiatriques (confusion, hallucinations). Ils seraient liés à une stimulation des récepteurs cortico-limbiques D3 et D4, mais peut-être également sérotoninergiques, si l'on en croit la plus forte incidence de ces manifestations rencontrée avec des molécules possédant une activité agoniste 5-HT (bromocriptine, lisuride) (Koller et Tolosa., 1998).

Ils sont recommandés en monothérapie pour le traitement initial afin de limiter l'apparition des dyskinésies (Damier, 2000 ; Schwarz, 2003).

Ces produits semblent cependant moins efficaces que la L-DOPA en monothérapie et une association avec cette dernière s'avère nécessaire après

quelques années. En outre, leur moins bonne tolérance cognitive et psychiatrique au traitement fait réserver leur utilisation à des sujets jeunes (<60 à 70 ans) (Inzelberg et coll., 1996).

3.1.1.3 Inhibiteurs enzymatiques

Le concept sous-jacent au développement de ces médicaments était de prolonger l'effet thérapeutique de la L-DOPA en inhibant les enzymes participant à sa dégradation. La MAO a été la première cible pharmacologique dans ce domaine, aboutissant à la commercialisation en Europe dans les années 70 de la sélégiline (Deprenyl*), inhibiteur non compétitif sélectif de la MAO-B. Ce produit possède un léger effet symptomatique propre et prolonge effectivement la durée d'action de la L-DOPA en inhibant la dégradation de la DA cérébrale (Lees et coll., 1977 ; Riederer et Youdim., 1986).

Les inhibiteurs de la Catéchol-O-Méthyl Transférase (COMT) sont des inhibiteurs compétitifs sélectifs de la COMT (Entacapone (Comtan*)).

Tous les ICOMT augmentent la biodisponibilité de la L-DOPA (au minimum doublement de l'aire sous la courbe) et sa demi-vie plasmatique. L'effet thérapeutique peut être considéré comme un lissage des concentrations plasmatiques en L-DOPA. Ces molécules ont montré une diminution de l'apparition des dyskinésies sur un modèle de singe MPTP (Jenner, 2004).

3.1.2 Agents non-dopaminergiques

Leur intérêt est actuellement limité en raison soit d'une mauvaise tolérance soit d'une efficacité partielle.

3.1.2.1 Les anti-cholinergiques

Ils réduisent l'hyperactivité cholinergique striatale résultant de la réduction du tonus inhibiteur dopaminergique. Classiquement, ils sont sensés agir préférentiellement sur la rigidité et le tremblement (Fahn, 1998), mais ont peu d'action sur les autres signes cliniques de la maladie (Uitti., 1998). Actuellement, ils ne sont plus guère utilisés en raison du fort risque d'effet indésirable. Outre le risque de décompensation d'un adénome prostatique ou d'un glaucome à angle fermé, ils sont à haut risque, en particulier chez les sujets de plus de 60 ans, de confusion, troubles mnésiques, ceci directement liés à l'activité anti-muscarinique.

3.1.2.2 Les antagonistes glutamatergiques

Les antagonistes du glutamate ont été proposés dans le traitement de la maladie de Parkinson sur la base de deux observations principales. Le noyau subthalamique, structure glutamatergique, présente une forte activité chez les patients parkinsoniens et semble jouer un rôle clef dans la physiopathologie de la maladie (Bergman et coll., 1990). D'autre part, cette hyperactivité pourrait participer ou accélérer le processus dégénératif (par excitotoxicité). La réduction de transmission glutamatergique pourrait donc être bénéfique sur la symptomatologie de la maladie et ralentir le processus dégénératif (Greenamyre et coll., 1994).

Chez l'homme, les antagonistes du glutamate actuellement disponibles sont des antagonistes non compétitifs des récepteurs NMDA (Kornhuber et coll., 1991). En association avec la L-DOPA, ils améliorent les patients souffrant de symptômes parkinsoniens faibles et modérés. Toutefois, ces effets concernent essentiellement l'akinésie et la rigidité et moins les tremblements (Parkes et coll., 1974 ; Koller., 1986). Ainsi, l'utilisation des antagonistes glutamatergiques chez les patients est

actuellement limitée à son association avec la L-DOPA. La limitation majeure à l'heure actuelle est leur manque de spécificité.

3.2 *Le traitement chirurgical*

L'insuffisance actuelle des traitements explique le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques : la neurostimulation du noyau sous thalamique (Limousin et coll., 1997 ; Bejjani et coll., 1999) agissant sur les dysfonctionnements situés en aval de la dénervation dopaminergique est l'un des traitements symptomatique les plus efficaces.

La stimulation cérébrale profonde

L'idée que la stimulation cérébrale profonde (ou stimulation à haute fréquence) pouvait constituer une thérapie dans le traitement de certaines maladies chroniques n'est pas récente (Brice et McLellan., 1980). Cette technique a été utilisée pour traiter d'autres pathologies que la maladie de Parkinson, telles que les douleurs chroniques pharmaco-résistantes (Ray et Burton, 1980). En 1987, Benabid et coll. ont montré que la stimulation cérébrale profonde à haute fréquence du noyau Vim du thalamus (un territoire cérébelleux de la masse latérale) entraînait chez les patients atteints d'un tremblement essentiel un arrêt du tremblement, résultats confirmés par d'autres équipes (Blond et coll., 1992 ; Tasker et coll., 1997). Ce résultat offrait une bonne alternative à la thalamotomie. Plus récemment, cette technique fut appliquée au pallidum (Siegfried et lippitz, 1994 ; Iacono et coll., 1995), et au noyau subthalamique (Pollak et coll., 1993 ; Limousin et coll., 1995 ; Pollak et coll., 1996 ; Krack et coll., 1997). La stimulation du noyau subthalamique, sans doute la plus efficace, améliore très nettement la symptomatologie parkinsonienne, certains effets secondaires de la L-DOPA et permet souvent la réduction de doses de celle-ci

voire même dans certains cas l'arrêt des prises. Le noyau subthalamique est considéré maintenant comme une cible privilégiée (figure 13).

Une étude récente sur des singes MPTP, réalisée par Palfi et coll. (2004), a montré qu'il était possible d'améliorer les symptômes parkinsoniens de ces singes par stimulation de la surface corticale.

Cette technique, si elle fonctionne chez l'homme, pourrait améliorer la technique de stimulation « profonde » du noyau subthalamique, car elle limiterait les risques opératoires.

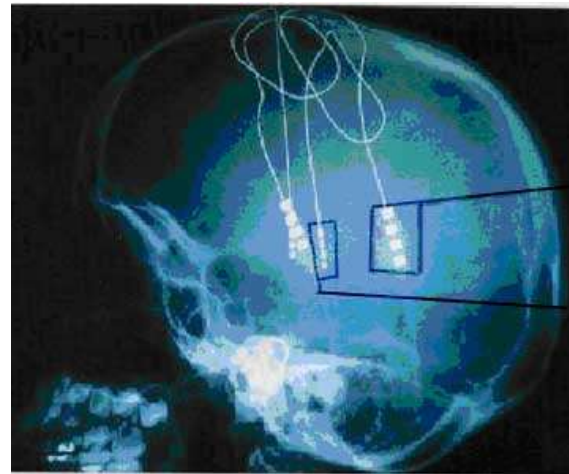


Figure 13 : Electrodes quadripolaires implantées de manière bilatérale dans le noyau subthalamique d'un patient parkinsonien

3.3 Perspectives thérapeutiques

Deux types de nouveaux traitements se développent : tout d'abord des traitements visant à agir sur les processus dégénératifs (neuroprotection) (Lin et coll., 1993 ; Bjorklund et coll., 1997 ; Alexi et coll., 2000), et d'autres traitements comme les transplantations intrastriales de cellules mésencéphaliques embryonnaires (Lindvall et coll., 1990) visant à rétablir une transmission dopaminergique plus physiologique car neuronale.

3.3.1 Thérapies visant à agir sur le processus dégénératif

3.3.1.1 Les traitements anti-oxydants

Un grand nombre de données suggèrent que le stress oxydant pourrait être une des causes du développement de la maladie de Parkinson (chapitre 1.5.4).

Différents antioxydants ont été testé d'abord sur des modèles expérimentaux, puis sur l'Homme pour quelques-uns d'entre eux.

Etudes sur les modèles expérimentaux

Il a été montré que le déprényl (selegiline) avait un effet protecteur sur la neurotoxicité du MPTP chez le singe (Tatton et Greenwood, 1991). Le déprényl est un inhibiteur de la MAO, qui métabolise la dopamine et produit du peroxyde d'hydrogène. Puisque le peroxyde d'hydrogène peut causer un stress oxydatif, particulièrement en présence de fer (chapitre 1.5.4), cet inhibiteur a été utilisé pour son effet potentiellement antioxydant (pour revue Knoll, 1998). Il est aussi établi que le déprényl est efficace contre le MPTP, car la MAO est nécessaire à la conversion du MPTP en sa forme toxique, le MPP⁺ (Chiba et coll., 1984).

Le « Nitric Oxyde synthase » (NOS), peut générer des radicaux libres peroxy-nitriques, et ainsi contribuer à l'augmentation du stress oxydant. Un inhibiteur de NOS, le 7-nitroindazole (7-NI), prévient la perte de la dopamine striatale (Schulz et coll., 1995) et la dégénérescence nigrale, chez la souris MPTP (Przedborski et coll., 1996) et chez le babouin. De plus, le 7-NI, efficace en administration systémique, peut améliorer les déficits moteurs et cognitifs chez le babouin (Hantraye et coll., 1996). D'autres inhibiteurs de NOS ont été utilisés sur des modèles expérimentaux : le N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (Connop et coll., 1996) et le S-méthylthiocitrulline (Matthews et coll., 1997b). De plus, les souris KO pour la forme neuronale de NOS, sont résistantes à la toxicité induite par MPTP et MPP⁺ (Przedborski et coll., 1996 ; Matthews et coll., 1997a). L'utilisation chez le rat 6-OHDA d'antioxydants comme le desferrioxamine, chélateur de fer ou l' α -tocophérol (vitamine E), « éboueur » de radicaux libres, pouvait prévenir la perte

dopaminergique de la SNpc et les déficits moteurs dans ce modèle (ben-Shachar et coll., 1991).

D'autres anti-oxydants ont été testés avec succès sur des modèles animaux de la maladie de Parkinson (Tableau 2). Toutes ces études ont montré qu'une large variété de substances anti-oxydantes pouvait protéger les neurones DA de la SNpc sur des modèles animaux de la maladie de Parkinson.

Etudes cliniques

Un essai clinique multicentrique a été initié en 1987 afin de tester l'effet d'antioxydants sur la maladie de Parkinson (la vitamine E et le déprényl): « deprenyl and tocopherol antioxidant therapy of Parkinson disease » (DATATOP). L'étude comprenait 800 patients et a montré que le déprényl pouvait retarder la prise de L-DOPA et entraîner un faible bénéfice symptomatique chez les patients dont la maladie était débutante (The Parkinson's study group, 1993). En revanche, l' α -tocophérol était sans effet. De plus, l'effet bénéfique du déprényl sur les patients avec une maladie de Parkinson précoce n'a pas été prolongé et ces patients ont tous été finalement traités par la L-DOPA (Shoulson et The Parkinson's study group, 1998). La question de savoir si l'action du déprényl observée est plutôt due à son effet antioxydant ou bien au fait qu'il augmente les concentrations en DA dans le cerveau en inhibant la dégradation par la MAO, reste pour le moment irrésolue (Olanow et coll., 1998).

Ainsi les traitements antioxydants sont efficaces sur les modèles animaux de la maladie de Parkinson, mais l'essai clinique DATATOP a montré des résultats chez l'Homme très modestes.

Agents antioxydants	Modèle utilisé
Deprenyl*	MPTP
α -tocopherol (vitamine E)*	6-OHDA
7-NI	MPTP, AM
L-NAME	AM
S-méthylthiocitrulline	MPTP
PBN/S-PBN	MPTP
Desferrioxamine	6-OHDA
Benzamide	MPTP
nNOS*	MPTP
SOD Tg	MPTP, 6-OHDA

Tableau 2 : Composés antioxydants ayant un effet protecteur sur les neurones dopaminergiques de modèles animaux de la maladie.
 * composés également testés en clinique, AM (Acide malonique)
 D'après Alexi et coll., 2001

3.3.1.2 Les traitements anti-apoptotiques

En utilisant des modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson, un grand nombre de protéines impliquées dans l'apoptose ont été mises en évidence, pouvant jouer un rôle dans la neurodégénérescence. Par exemple, les souris transgéniques surexprimant le gène anti-apoptotique bcl-2 sont résistantes à la toxicité induite par le MPTP (Offen et coll., 1998 ; Yang et coll., 1998) ; inversement, les souris KO pour le gène pro-apoptotique p53 sont résistantes à la toxicité du MPTP (Trimmer et coll., 1996). De plus, le MPTP pourrait induire l'expression du gène pro-apoptotique bax chez la souris (Hassouna et coll., 1996). Des études plus récentes ont montré l'implication de la super famille des caspases, comme pouvant jouer un rôle dans la toxicité du MPTP/MPP+.

C'est donc logiquement que des inhibiteurs d'apoptose ont été utilisés sur ces modèles. Des inhibiteurs de la caspase 3, la protéase zVAD-fmk (N-benzyloxycarbonylvaline-alanine-aspartate-(OMe)-⁻fluoromethylketone) et l'Ac-DEVD-CHO (acétyle-aspartate-glutamate-valine-aspartate-aldéhyde) atténuaient la mort des neurones dopaminergiques par le MPTP *in vitro* (Dodel et coll, 1998). De plus, un autre inhibiteur de caspase, l'acétyle-tyrosine-valine-alanine-aspartate-chloromethylketone (Ac.-YVAD-cmk), a significativement augmenté la survie de neurones dopaminergiques greffés à la fois sur des rats lésés à la 6-OHDA et non lésés (Schierle et coll, 1999).

Ainsi, les traitements anti-apoptotiques constituent une approche récente, techniquement plus complexe car impliquant toute une série de gènes, associée à toute une série de signaux physiologiques. Cette thérapie est prometteuse mais nécessite davantage de recherche avant d'être envisagée chez l'Homme.

3.3.1.3 Les thérapies anti-excitotoxiques

Des phénomènes d'excitotoxicité pourraient participer à la mort des neurones DA (en particulier via l'activation des récepteurs NMDA). Les sources principales de glutamate au niveau de la substance noire sont le noyau subthalamique et le noyau pédonculopontin (Kita et Kitai, 1987 ; Lavoie et Parent, 1994).

Un grand nombre d'études ont montré que l'utilisation de différents antagonistes de l'excitotoxicité, comme des antagonistes du récepteur NMDA MK801, l'acide 3-((2)-2- carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphoric (CPP), l'anticonvulsant riluzole (2-amino-6-trifluorométhoxy-benzothiazole) et la remacemide, interférant tous avec la transmission glutamatergique, pouvaient améliorer les symptômes parkinsoniens comme la rigidité et l'akinésie sur des modèles animaux de la maladie

de Parkinson (Klockgether et Turski, 1990 ; Klockgether et coll., 1991 ; Zuddas et coll., 1992 ; Greenamyre et coll., 1994 ; Benazzouz et coll., 1995 ; Barnéoud et coll., 1996). Cependant, certains groupes n'ont pas réussi à reproduire ces résultats (Sonsalla et coll., 1992a ; 1992b) et il a été suggéré que l'antagoniste MK801 retardait uniquement la toxicité du MPTP sur les neurones de la SNpc mais ne les protégeait pas à long terme (Chan et coll., 1997). De plus, le fait de supprimer le NST aide à restaurer une neurotransmission normale au sein des ganglions de la base (Bergman et coll., 1990 ; Chesselet et Delfs, 1996 ; Blandini et Greenamyre, 1998) et peut être neuroprotecteur en supprimant l'excès de glutamate vers la substance noire (Rodriguez et coll., 1998).

Ainsi, diminuer la neurotransmission excitatrice dans la substance noire permet des améliorations symptomatiques de la maladie de Parkinson sans pour autant avoir un réel effet neuroprotecteur. Néanmoins, il est probable que l'excitotoxicité puisse jouer un certain rôle dans le neurodégénérescence dans la maladie de Parkinson ; un traitement anti-excitotoxique pourrait avoir des effets neuroprotecteurs et au minimum un effet symptomatique.

3.3.1.4 Les traitements anti-inflammatoires

L'utilisation de médicaments anti-inflammatoires pour protéger les neurones dopaminergiques de la dégénérescence, n'a pas été encore testée de manière formelle chez les patients. Le concept selon lequel les anti-inflammatoires pourraient avoir un effet bénéfique dans la maladie de Parkinson provient des études précliniques réalisées *in vivo* et *in vitro* sur des modèles de la maladie de Parkinson. In vivo, différentes molécules ont été testées avec des résultats variables, comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) avec leurs cibles COX, NFkB, et d'autres

stéroïdiens comme l'immunophiline, la thalidomide et l'inhibiteur de la phosphodiesterase IV (Tableau 3 Hirsch et coll., 2003).

Substance	Action	Dose	Model	Regimen	Parameter	Protection
salicylate	COX1/2, NFκB, radicals ↓	100 mg/kg ip -1h or +1h	MPTP mouse ¹	1x 15 mg/kg sc ↑ 2ds	ST: DA, metabolites	complete
		50 mg/kg ip -0.5h 2x	MPTP mouse (BALB/c)	2x30 mg/kg ip 16h interval ↑ 7ds	ST: DA, metabolites, GSH SN: GSH behavioral study	ST: complete ² SN: incomplete motor deficit ↓
aspirin	COX1/2, NFκB, radicals ↓	100 mg/kg ip -1h or +1h	MPTP mouse	1x 15 mg/kg sc ↑ 2ds	ST: DA, metabolites	complete
		100 mg/kg ip -0h	MPTP mouse	1x 30 mg/kg sc ↑ 7ds	ST: DA, metabolites SN: TH, Nissl behavioral study	ST: incomplete ³ SN: complete motor deficit ↓
meloxicam	COX2	50 mg/kg ip -0h	MPTP mouse	1x 30 mg/kg ip ↑ 7ds	ST: DA, metabolites SN: TH, Nissl	ST: incomplete ⁴ SN: near complete
paracetamol	COX1/2	100 mg/kg ip -1h	MPTP mouse	1x 15 mg/kg sc ↑ 2ds	ST: DA, metabolites	none
diclofenac	COX1/2	100 mg/kg ip -1h	MPTP mouse	1x 15 mg/kg sc ↑ 2ds	ST: DA, metabolites	none
ibuprofen	COX1/2, PPAR_γ	20 mg/kg ip -1h	MPTP mouse	1x 15 mg/kg sc ↑ 2ds	ST: DA, metabolites	none
indomethacin	COX1/2, PPAR_γ	100 mg/kg ip -1h	MPTP mouse	1x 15 mg/kg sc ↑ 2ds	ST: DA, metabolites	none
		1 mg/kg ⁵ ip -24h and 1x/2ds until ↑	MPTP mouse (age 8-10 ms)	4x10 mg/kg ip at 1h interval ↑ 3/ 7ds	ST: DA SN: TH, microglial and lymphocytic marker	ST: incomplete at ↑ 7ds ⁶ SN: incomplete ⁷ , micro- glia ↓, lymphocytes ↓

Tableau 3 : Différentes molécules anti-inflammatoires et leurs cibles, utilisées sur des modèles expérimentaux de la MP (d'après Hirsch et coll., 2003)

De plus, les manipulations génétiques sur des souris ont montré que COX2 et iNOS pouvaient être particulièrement intéressante dans le développement de ces stratégies (pour revue Hirsch et coll., 2003). Cependant, il apparaît que la manipulation d'une seule voie spécifique ou en aval des processus inflammatoires ne protégerait pas de la dégénérescence des neurones DA dans la maladie de Parkinson. Par contre, des molécules avec un spectre d'action plus large seraient plus susceptibles de protéger ces neurones de la dégénérescence. De plus, plusieurs cytokines sont impliquées dans l'inflammation dans les modèles animaux de la maladie de Parkinson et bloquer une seule de ces voies ne permet pas de bloquer les autres et d'empêcher la neurodégénérescence (Rousselet et coll., 2002).

Ont été testés également des agonistes du « peroxisome proliferator-activated receptor- γ » (PPAR- γ), membre de la super famille de récepteurs nucléaires, qui inhibe l'inflammation (probablement en empêchant l'activation de NF κ B) in vitro de différents types cellulaires : monocytes-macrophages (Jiang et coll., 1998 ; Ricote et coll., 1998) et microglie (Combs et coll., 2000), et in vivo (Heneka, et coll., 2000). L'utilisation de pioglitazone (un agoniste de PPAR- γ utilisée chez les diabétiques) diminue la neurodégénérescence DA dans la SNpc de souris intoxiquées au MPTP (Breidert et coll., 2002). En revanche, la pioglitazone n'a pas d'effet sur la réaction microgliale dans le striatum de ces animaux (Liberatore et coll., 1999 ; Dehmer et coll., 2000). Ceci indique que les stratégies neuroprotectives doivent à la fois intervenir au niveau des corps cellulaires et des terminaisons nerveuses. Récemment, la minocycline, du groupe des tétracyclines, inhibiteurs de la microglie, réduit l'activation microgliale et protège les neurones dopaminergiques à la fois au niveau de la substance noire et de ses terminaisons sur des modèles de souris MPTP (Du et coll., 2001 ; Wu et coll., 2002) et de rats 6-OHDA (He et coll., 2001). Ces résultats suggèrent que la microglie pourrait avoir un effet délétère dans la maladie de Parkinson.

Ainsi, ces résultats montrent que la microglie pourrait jouer un rôle dans le processus dégénératif dans la maladie de Parkinson. La manipulation pharmacologique de ces composés permet d'avoir un effet protecteur sur des modèles animaux de la maladie de Parkinson. Il reste encore à vérifier si de telles molécules pourraient avoir un effet dans la maladie de Parkinson chez l'Homme. Les études épidémiologiques de l'effet des AINS sur la maladie de Parkinson pourraient aider à répondre à cette question avant d'envisager des essais cliniques.

3.3.1.5 Les facteurs neurotrophiques

Une nouvelle approche thérapeutique est la protection des neurones dopaminergiques contre les processus dégénératifs. Cette stratégie est basée sur l'apport de facteurs de croissance neurotrophiques, protéines connues pour empêcher la mort des neurones durant le développement embryonnaire, mais aussi chez l'adulte en cas de lésion (Beck et coll., 1995 ; Yan et coll., 1995). Les neurones dopaminergiques de la substance noire possèdent des récepteurs qui leur permettent de répondre à de nombreux facteurs neurotrophiques, comme le BDNF (brain-derived neurotrophic factor), la neurotrophine 3, et surtout le GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) (Hyman et coll., 1994 ; Matsuo et coll., 2000). Un apport en GDNF, notamment par injection intra-striatale, intra-nigrée ou intracérébroventriculaire, protège efficacement les corps cellulaires des neurones dopaminergiques contre diverses atteintes toxiques, notamment par la 6-OHDA ou le MPTP (Hoffer et coll., 1994 ; Tomac et coll., 1995 ; Gash et coll., 1996 ; Rosenblad et coll., 1999). Mais seule l'injection intra-striatale de GDNF permet la protection des terminaisons axonales dans le striatum (figure 14) (pour revue : Björklund et coll., 2000 ; Kirik et coll., 2004). L'apport de ce facteur aux patients parkinsoniens pourrait donc contribuer à ralentir, voire à arrêter, le processus dégénératif et favoriser la réafférentation des territoires dénervés. Cependant chez l'homme, son efficacité en infusion striatale reste controversée : une première étude pilote (Gill et coll., 2003) ayant montré une amélioration des patients, n'a pas été confirmée par une étude plus conséquente (Nutt et al. 2003).

Etant donné que ces facteurs neurotrophiques ne peuvent transiter au travers de la BHE et que leur action dans le SNC n'est pas restreinte aux neurones dopaminergiques seuls, une administration locale est indispensable.

Expérimentalement, une libération locale du facteur neurotrophique peut être obtenue par instillation au moyen de mini-pompes osmotiques au travers de canules implantées par stéréotaxie au voisinage des neurones à traiter (Yurek, 1998), ou par implantation de microsphères biodégradables (Menei et coll., 2000 ; Gouhier et coll., 2002). Il est également possible d'implanter des cellules génétiquement modifiées afin de produire le facteur d'intérêt. Celles-ci sont alors enrobées dans des capsules semi-perméables pour éviter leur rejet dans le cerveau du receveur (pour revue : Zurn et coll., 2001). Une autre voie prometteuse consiste à construire et à injecter dans le cerveau des virus recombinants capables d'exprimer le gène codant pour le facteur neurotrophique. De tels vecteurs sont actuellement dérivés de l'adénovirus, de lentivirus ou de virus associé à l'adénovirus (AAV) (pour revue : Björklund et coll., 2000). Des virus codant pour le GDNF ont montré leur intérêt dans les modèles animaux de maladie de Parkinson (Bilang-Bleuel et coll., 1997 ; Kordower et coll., 2000 ; McGrath et coll. 2002). Une autre stratégie originale consiste à induire une expression ectopique du récepteur d'un facteur neurotrophique afin que les facteurs endogènes et exogènes assurent la survie des neurones cibles. Un modèle de cette stratégie a été développé par l'équipe du Dr. Brachet. Ainsi l'expression de TrkA, récepteur au NGF (nerve growth factor) a été induite dans les neurones de la substance noire afin de rendre les neurones dopaminergiques sensibles au NGF présent au niveau de leurs terminaisons axonales dans le striatum. Ces neurones ainsi transfectés avec un AAVTrKA sont protégés d'une lésion par la 6-OHDA (Melchior et coll., 2003).

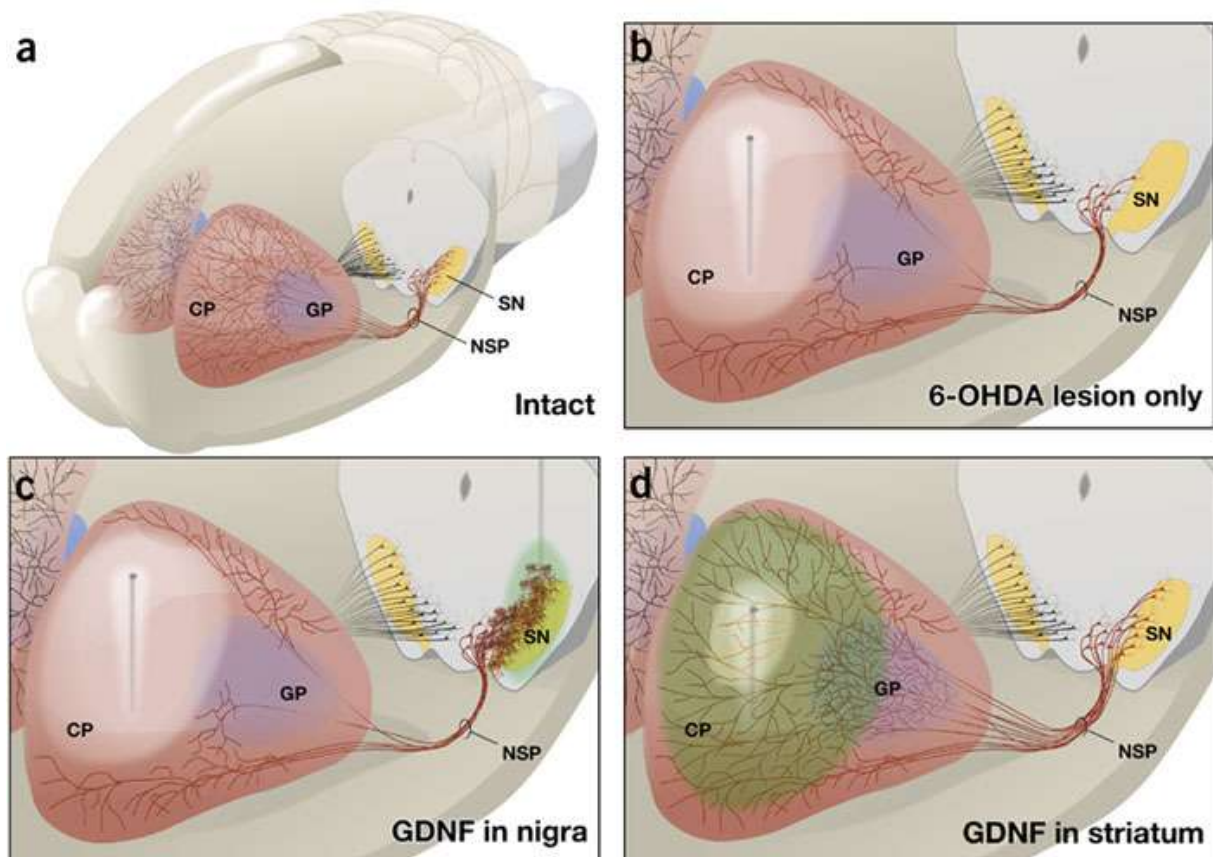


Figure 14 : Les effets protecteurs du GDNF dans le modèle de lésion intra-striatale par la 6-OHDA

Dans le cerveau intact (**A**), les neurones dopaminergiques résident dans la substance noire (**SN**) et envoient leurs projections axonales (**NSP**: projection nigro-striée) dans le striatum (**CP**, caudate putamen, et **GP**, globus pallidus). L'injection de 6-OHDA dans le striatum (**B**) entraîne une déplétion partielle des terminaisons nerveuses, qui est suivie d'une dégénérescence rétrograde des neurones de la substance noire. L'injection de GDNF près des corps cellulaires (**C**), c'est à dire dans la substance noire (halo vert), prévient efficacement la dégénérescence des neurones lésés mais n'exerce aucun effet sur la dégénérescence de leurs terminaisons nerveuses. Par contre, l'apport de GDNF dans le striatum (**D**) protège non seulement les corps cellulaires mais également leurs fibres dans le striatum. D'après Kirik et coll., 2004.

3.3.2 Les greffes de tissus embryonnaires

Une autre possibilité de thérapie a été envisagée, il s'agit des greffes de neurones. Cette stratégie est la plus logique puisqu'elle vise à remplacer les neurones dopaminergiques morts par d'autres neurones embryonnaires.

3.3.2.1 L'expérimentation animale

Le parenchyme cérébral adulte est un terrain très peu propice à la croissance axonale. C'est pourquoi la ré innervation du striatum à partir de neurones implantés dans la substance noire est extrêmement limitée (pour revue Isacson et Deacon, 1997); cependant, une croissance axonale locale reste possible. Chez le rat adulte, l'allogreffe de cellules neuronales mésencéphaliques embryonnaires dans le cortex a constitué un modèle de croissance de projections dopaminergiques néoformées. Elle a généré une nouvelle voie dopaminergique du cortex vers le striatum, précédemment dénervé par une lésion de la substance noire par la 6-OHDA (Björklund et Stenevi, 1979). Ce type de greffe, effectué par la suite directement dans le striatum de rats lésés par la 6-OHDA, a également permis de constater la survie des cellules neuronales foetales dans le cerveau du rat adulte, ainsi que leur aptitude à émettre des axones colonisant le striatum lésé (Perlow et coll., 1979). De plus, les neurones dopaminergiques foetaux greffés pourraient reconstituer une cytoarchitecture au sein du striatum (Schmidt et coll. 1982 ; Doucet et coll. 1989). Cependant, l'extension des fibres neuronales est relativement restreinte et la ré-innervation est limitée au parenchyme striatal entourant le greffon (pour revue : Herman et Arous, 1994). Ces expérimentations ont également montré que des neurones foetaux allogéniques survivaient efficacement dans le striatum sans traitement immunosuppresseur. Le greffon paraît ainsi immunologiquement inerte vis

à vis du système immunitaire de l'hôte. Cependant, cet état apparent de tolérance peut être rompu par une réaction de rejet, induite dans un tissu périphérique. Duan et ses collaborateurs ont ainsi montré qu'une greffe de peau du donneur peut provoquer une réaction de rejet chez le receveur (Duan et coll. 1997). Dans ces modèles animaux de maladie de Parkinson, l'intérêt de la transplantation intrastriatale de cellules dopaminergiques, dérivées du mésencéphale ventral foetal, a été démontré par la mise en évidence d'une amélioration des déficits moteurs dus à la déplétion en dopamine dans le striatum. Cette amélioration s'est en particulier traduite par la disparition du comportement rotatoire dans le cas de lésions unilatérales. L'implantation de tissu dopaminergique foetal d'origine humaine dans le striatum de rat « parkinsonien » sous immunosuppression ayant induit des récupérations similaires (Brundin et coll., 1986), la recherche de nouvelles stratégies restauratrices médicales contre la maladie de Parkinson s'est orientée vers l'allotransplantation de tissu dopaminergique issu de mésencéphales ventraux, obtenus à partir de fœtus humains.

3.3.2.2 L'allotransplantation en clinique

3.3.2.2.1 Le suivi des greffes intra-striatales chez l'homme : l'imagerie par TEP

Les bénéfices apportés par les greffes de neurones dopaminergiques chez les patients parkinsoniens peuvent être évalués grâce à une technique d'imagerie médicale : la tomographie par émission de positons (dite TEP, ou PETscan). Relativement nouvelle dans son usage médical, cette technique permet d'obtenir, *in vivo* chez l'homme et de manière atraumatique, la cartographie tridimensionnelle au sein des organes, d'un paramètre physiologique, comme par exemple la densité de

récepteurs pour un neurotransmetteur donné. Reconnu comme un outil important, performant et précis, l'imagerie par TEP permet d'explorer le fonctionnement cérébral, et plus précisément d'évaluer l'activité et les perturbations cérébrales dans de nombreuses maladies du système nerveux, comme la maladie de Parkinson, des accidents vasculaires cérébraux, des tumeurs cérébrales, ou encore des affections psychiatriques. Cette technologie associe trois éléments : une molécule marquée, isotope émetteur de positons facilement incorporable à des molécules biologiques et qui peut être injecté dans le corps du patient, un capteur qui détecte et enregistre les 2 photons émis simultanément lors de la rencontre du positon avec un électron, et un système informatique de reconstitution d'image. Dans la maladie de Parkinson, la fluoro-DOPA ([^{18}F]-L-DOPA) est le traceur qui permet de confirmer la disparition des neurones dopaminergiques après un examen des signes cliniques moteurs, et d'évaluer le taux de progression de l'atteinte neuronale. En effet, la quantité de fluoro-DOPA capturée au niveau des transporteurs dopaminergiques est proportionnelle à la densité des fibres dopaminergiques, et donc au nombre de neurones survivants. Son augmentation, après la greffe intra-cérébrale de neurones dopaminergiques, est associée à l'amélioration des signes cliniques, et témoigne des bénéfices de la greffe (figure 15) (Rémy et coll., 1995 ; Brooks, 2003).

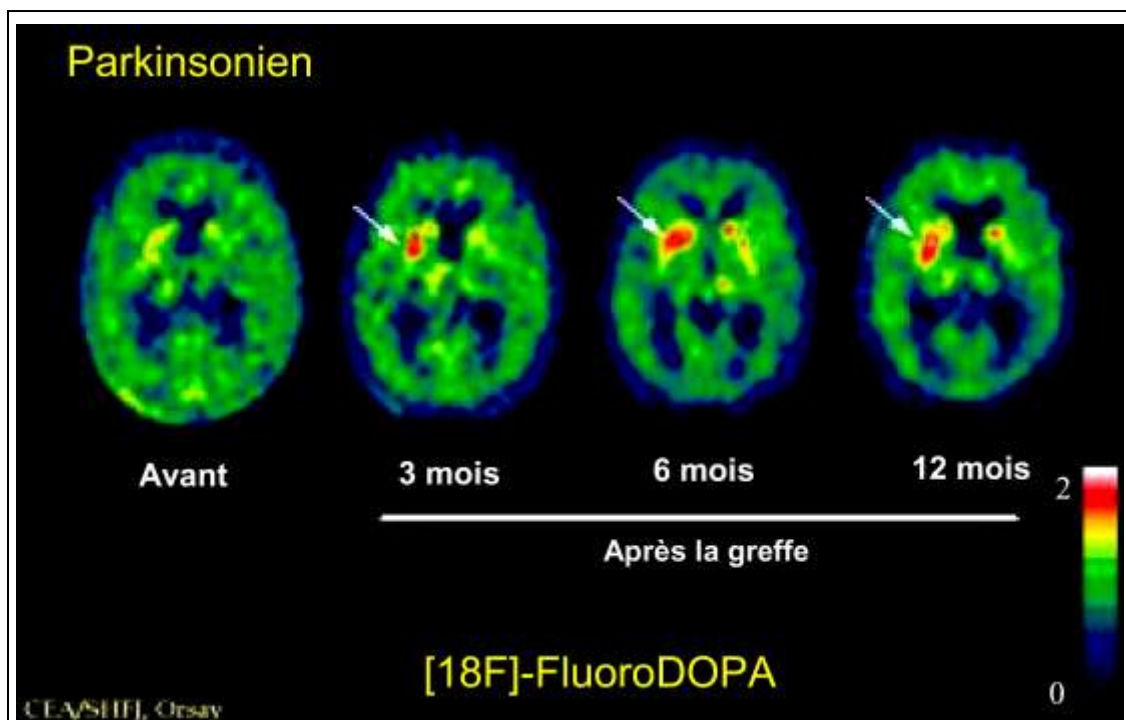


Figure 15 : Le suivi de l'effet des greffes neuronales *in vivo* par TEP

Cette série de quatre images résume l'évolution de la fonction dopaminergique striatale chez un patient atteint de maladie de Parkinson, avant (image de gauche) et 3, 6 et 12 mois après que celui-ci ait reçu une greffe de neurones embryonnaires mésencéphaliques dans le striatum gauche (images suivantes). Avant greffe, l'imagerie TEP avait permis de constater une disparition presque complète du signal $[18F]$ -LDOPA chez ce malade, qui présentait une forme très évoluée de la maladie. Dès le 3^{ème} mois après la greffe, on constate du côté transplanté une augmentation du signal TEP correspondant à la greffe (flèche blanche). Cette augmentation se poursuit jusqu'à 12 mois et s'accompagne d'une amélioration clinique significative.
D'après Rémy et coll., 1995.

3.3.2.2.2 Les essais cliniques

Les premiers essais cliniques chez l'homme ont débuté à la fin des années 80. Ils concernaient des patients atteints de la maladie de Parkinson depuis plus de 10 ans, chez lesquels le traitement médical était devenu insuffisant (augmentation des périodes Off sous traitement par la L-DOPA). Le tissu, issu du mésencéphale ventral d'embryons humains de 6 à 9 semaines, est greffé par stéréotaxie dans le

striatum (précisément dans le putamen) des patients soumis, dans la plupart des essais, à un traitement immunosuppresseur durant les six mois suivant la greffe. Les premiers essais de transplantation ont montré que le tissu mésencéphalique pouvait être greffé dans le striatum de patients atteints de maladie de Parkinson sans provoquer de complication majeure (Lindvall et coll., 1988). Après deux ans de suivi, les deux premières patientes greffées ont présenté une réduction modeste des symptômes parkinsoniens qui s'accordait avec des changements mineurs de capture de fluoro-DOPA mesurée dans le striatum par la TEP. Par la suite, une amélioration de la procédure chirurgicale de transplantation a permis d'observer chez un troisième patient, cinq mois après la greffe, à la fois un effet fonctionnel marqué et une augmentation significative de la capture striatale de fluoro-DOPA sur la TEP (Lindvall et coll., 1990). Ces premiers résultats furent très encourageants puisqu'ils montraient d'une part, que la greffe mésencéphalique pouvait restaurer la synthèse de dopamine ainsi que son stockage dans le striatum humain dénervé, et d'autre part, que cette restauration menait à une amélioration significative de la fonction motrice chez le patient atteint de maladie de Parkinson idiopathique. L'intérêt de cette technique de transplantation chez le malade parkinsonien a été confirmé par les résultats encourageants obtenus par le suivi à long terme de ce patient et les améliorations observées chez un quatrième patient greffé dans les mêmes conditions. En effet, trois ans après leur greffe, ces deux patients ont présenté une réduction de la durée et du nombre quotidien de périodes off, permettant la diminution de prise unique de L-DOPA et la prolongation de son effet. L'augmentation de la capture de fluoro-DOPA dans le striatum greffé, observée par la TEP, a confirmé la survie et l'activité fonctionnelle de la greffe mésencéphalique (Lindvall et coll., 1992 et 1994). De même, l'équipe française de P. Cesaro a observé

une amélioration motrice chez deux patients transplantés unilatéralement, et a suggéré la nécessité d'une transplantation bilatérale pour obtenir des effets moteurs bilatéraux de même ampleur (Peschanski et coll., 1994). Ces premiers essais cliniques ont conforté l'idée que la greffe neuronale pouvait être développée comme traitement des patients atteints de maladie de Parkinson. Ainsi, durant les 15 dernières années, plusieurs études cliniques ont été menées chez plus de 350 personnes atteintes de maladie de Parkinson, afin de soutenir la faisabilité des transplantations intra-cérébrales allogéniques, mais aussi pour mesurer la récupération fonctionnelle consécutive à l'application de cette technique (Widner et coll., 1992 ; Freeman et coll., 1995 ; Kordower et coll., 1995 ; Wenning et coll., 1997). L'étude d'un patient, 10 ans après transplantation dans le striatum, a prouvé que la libération de dopamine dans cette structure était un processus de restauration stable sur le long terme (Piccini et coll., 1999a). Différentes approches ont été réalisées afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique de cette méthode, notamment la greffe bilatérale (Hauser et coll., 1999) et les greffes consécutives (Hagell et coll., 1999). Cette première phase d'essais cliniques, réalisés en « ouvert » sur de petites séries de patients, ayant démontré la faisabilité de la transplantation comme thérapie dans la maladie de Parkinson, l'institut national de la santé américain a décidé de supporter une seconde phase d'essais cliniques.

Deux essais en « double aveugle » ont ainsi débuté en 1999 chez 40 patients afin de comparer les effets de la transplantation versus une opération « placebo » chez des patients parkinsoniens et de déterminer l'efficacité et la sécurité d'une telle technique. La première étude « Denver-Columbia » (Freed et coll., 2001) révèle que seuls les patients greffés âgés de moins de 60 ans présentent une amélioration significative de leur état (Freed et coll., 2001). Cependant plusieurs des patients ont

aussi développé des dyskinésies sévères qui, selon l'équipe américaine, seraient liées à des problèmes techniques pouvant conduire à une réafférentation neuronale du striatum excessivement hétérogène ; des réactions de rejet immunologique ont également été évoquées. Le nombre limité d'embryons utilisés dans cette étude, les sites d'implantation restreints dans le cerveau, amènent à des remaniements des protocoles expérimentaux (Olanow et coll., 2001). La deuxième étude « Tampa-Mount-Sinai » (Olanow et coll., 2003), menée avec un protocole de greffe différent, n'a pas montré de différence du score UPDRS entre les patients greffés et les patients « placebo » après 24 mois. De plus, comme dans l'étude précédente, certains patients ont développés des dyskinésies sévères suite à la greffe. L'absence d'immunosuppression dans l'étude « Denver-Columbia » et l'arrêt de l'immunosuppression 6 mois après la greffe dans l'étude « Tampa-Mont-Sinai » pourraient expliquer en partie ces résultats négatifs (pour revue Winkler et coll., 2005).

Ainsi, les échecs de ces 2 études américaines menées en double aveugle contre placebo, ont montré que beaucoup de facteurs nécessitent d'être clairement étudiés avant d'envisager d'autres essais : certains aspects de la procédure de transplantation (nombres de cellules à greffer, sites d'implantations), stockage des tissus et leurs préparations, la sélection des patients et le traitement immunosuppressif.

3.4 Conclusion

Ainsi, le traitement par la L-DOPA est le traitement le plus logique de la maladie de Parkinson puisqu'il rapporte au striatum de la dopamine. Cependant malgré sa grande efficacité pendant les premières années de traitement, des effets secondaires (dyskinésies et fluctuation motrice) apparaissent. Ceci est probablement

du au caractère insuffisamment physiologique du rétablissement dopaminergique, associé à une dégénérescence qui continue inexorablement.

Ces dernières années, l'amélioration de nos connaissances sur la physiopathologie de la maladie grâce à l'utilisation de modèles animaux adaptés, ont vu l'apparition de nouvelles stratégies thérapeutiques chirurgicales. Parmi elles, les greffes intracérébrales constituent la voie thérapeutique la plus séduisante puisqu'elles visent à remplacer les neurones morts par des neurones dopaminergiques et représente ainsi le seul traitement curatif envisageable.

Concernant les greffes striatales, des résultats positifs indiscutables ont été obtenus chez les patients (Kordower et coll., 1995 ; Peschanski et coll., 1994). Néanmoins, si la survie des greffons semble actuellement correcte, un grand nombre d'inconnues persiste (site optimal, quantité de cellules à greffer). De plus, 2 études américaines récentes (Freed et coll., 2001 ; Olanow et coll., 2003) menées en double aveugle contre placebo, nous rapportent l'apparition de dyskinésies sous greffes de patients sevrés en L-DOPA, ainsi qu'une faible récupération motrice. Ceci nous montre encore que le rétablissement dopaminergique n'est pas optimal. Avant d'envisager l'utilisation de greffes (cellules fœtales mais aussi dans les années à venir allogreffes ou greffes de cellules souches) pour traiter des patients atteints de maladie de Parkinson, ces inconnues doivent impérativement être précisées.

OBJECTIFS

L'objectif de cette thèse est de développer un modèle de rat le plus proche possible de la maladie de Parkinson humaine pour optimiser les stratégies de rétablissement de la transmission dopaminergique.

1 Développement d'un modèle de rats présentant des dyskinésies

L'objectif de cette étude, est double : premièrement elle consiste à mettre au point un modèle de rat développant des dyskinésies sous traitement par la L-DOPA et deuxièmement d'étudier l'effet de différents degrés de sévérité de lésions dopaminergiques provoquées par différentes doses de 6-OHDA (injectées au niveau de la substantia nigra) sur la survenue de dyskinésies.

La physiopathologie des dyskinésies reste encore mal connue, deux facteurs semblent jouer un rôle dans leurs survenues : le type de traitement dopaminergique et l'importance de la perte dopaminergique. Plusieurs travaux semblaient indiquer que l'importance des dyskinésies était liée à la perte dopaminergique, mais aucune étude claire n'a été réalisée. Par conséquent, il nous semble intéressant de faire la corrélation sur un modèle simple (unilatéral partiel), entre l'importance de la perte dopaminergique quantifiée par comptage immunohistochimique et la sévérité des dyskinésies provoquées par la L-DOPA.

Cependant la maladie humaine est bilatérale, et pour se rapprocher de la problématique humaine en transplantation, il est important d'affiner le modèle actuel, pour disposer d'un modèle le plus proche possible de clinique.

2 Développement d'un modèle animal le plus proche possible de la maladie de Parkinson humaine

Le modèle le plus couramment utilisé chez le rat est le modèle unilatéral par injection de 6-OHDA dans le Faisceau Médian du Télencéphale (FMT). Cependant, chez l'homme, le processus dégénératif affecte les 2 hémisphères. C'est pourquoi, un modèle de lésion partielle bilatérale serait plus proche de la maladie humaine. Mais, depuis près de 30 ans (Ungerstedt et coll., 1970) le modèle bilatéral par injection de 6-OHDA dans le FMT est considéré comme non viable. L'objectif de ce travail est de mettre au point un modèle de lésion bilatérale partielle viable, respectant pratiquement toutes les caractéristiques de la maladie humaine CAD :

- 1) Atténuation du comportement moteur spontané.
- 2) Récupération totale de ces modifications comportementales après traitement oral par L-DOPA.
- 3) Genèse de dyskinésies par traitement par L-DOPA.
- 4) lésion partielle bilatérale des neurones DA de la SNpc, avec une topographie lésionnelle proche de celle observée chez l'homme.

3 Caractérisation, d'un point de vue moléculaire, de l'environnement trophique et immunologique de ce modèle

Avant d'envisager une approche de thérapie cellulaire dans ce modèle, il est important de caractériser le contexte immunologique et trophique consécutif à la lésion bilatérale du faisceau nigro-strié. En effet, la mort cellulaire dans les modèles de rat 6-OHDA est médiée par le stress oxydatif. Une réaction inflammatoire consécutive à la lésion a été décrite dans la littérature ; elle est caractérisée par la sécrétion de cytokines proinflammatoires par la microglie activée. Ces dernières sont

aussi connues pour sécréter des facteurs trophiques bénéfiques à la survie cellulaire. Cette étude va nous donner une idée de la cinétique d'expression de facteurs trophiques et inflammatoires entre des rats lésés de manière bilatérale et des rats shams, et nous permettra de mieux comprendre la survie ou non des greffons.

4 Quelle est la méthode la plus physiologique de rétablissement dopaminergique pour traiter la maladie de Parkinson ?

Un des problèmes des greffes effectuées à l'heure actuelle chez l'homme, est d'être en site ectopique (car au niveau du striatum), ce qui, en particulier, ne rétablit pas la compensation dopaminergique au niveau nigral, apportée normalement par la libération dendritique de dopamine au niveau de cette structure (Cheramy et coll., 1981). Or cet élément joue peut être un rôle important dans la qualité de la correction du syndrome dopaminergique et éventuellement dans la genèse des complications provoquées par le traitement. C'est pourquoi, nous comparerons les greffes striatales (actuellement la technique utilisée chez l'homme) aux greffes nigrales et striatales. De façon récente, une équipe canadienne vient de montrer que la pratique de greffes dopaminergiques concomitantes dans le striatum et dans la substance noire chez des rats parkinsoniens (par lésion unilatérale à la 6 OHDA) est faisable et que les animaux semblent avoir une meilleure récupération fonctionnelle que les animaux avec une greffe dans le seul striatum (Baker et coll., 2000 ; Mukhida et coll., 2001).

L'objectif est donc de rechercher la méthode la plus "physiologique" de rétablissement de la transmission dopaminergique. Pour ce faire, nous proposons de comparer les effets cliniques (correction du syndrome parkinsonien, développement d'une hypersensibilité à la L-DOPA) avec l'analyse histologique de 3 modalités de "réparation dopaminergique" :

- Traitement par L-DOPA oral
- Greffes de cellules dopaminergiques embryonnaires dans le striatum
- Greffes nigrales et striatales

***CONSIDERATIONS
METHODOLOGIQUES***

1 Modèles 6-OHDA utilisés

Le modèle de rat Parkinsonien obtenu par injection de 6-OHDA dans la voie nigro-striée, est utilisé depuis les années 70 (Ungerstedt, 1970). Plusieurs modèles peuvent être proposés en fonction du site d'injection, chaque modèle présentant des avantages et des inconvénients (cf chapitre 2.3.2.4 de l'introduction).

Durant toute cette thèse, la même souche non consanguine de SPD mâles fournis par Charles River (Rouen, France) a été utilisée. Cette souche de rat est considérée comme étant adaptée aux tests comportementaux. Ces rats sont maintenus dans une pièce à 22°C avec une alternance lumière / obscurité de 12h et avec libre accès à la nourriture (*ad libitum*).

Au cours de cette thèse, différents modèles de rats 6-OHDA ont été utilisés dans le but d'obtenir un modèle se rapprochant le plus possible de la maladie humaine.

1.1 Lésions unilatérales

Deux types de modèles unilatéraux ont été utilisés : le modèle unilatéral total obtenu par injection d'une forte dose de 6-OHDA dans le FMT, et un modèle unilatéral partiel obtenu par injection d'une faible dose de 6-OHDA dans la SNpc.

La lésion unilatérale totale : ce modèle a été utilisé pour se familiariser avec la stéréotaxie. Il est obtenu par 2 injections de 6-OHDA respectivement 7.5 et 6µg, par stéréotaxie, dans le faisceau médian du télencéphale, aux coordonnées suivantes :

A : -4.4 mm, L : +1.2 mm, V : +7.8 mm ; barre des dents : -2.4 mm

A : -4.0 mm, L : +0.75 mm, V : +8.0 mm ; barre des dents : +3.4 mm

(par rapport au bregma, d'après l'atlas de Paxinos et Watson., 1982) (Cenci et coll., 1998)

Ces lésions sont trop sévères et touchent des régions rarement atteintes dans la maladie de Parkinson humaine, c'est pourquoi nous avons utilisé un modèle plus sélectif par injection de doses modérées de 6-OHDA dans la SNpc.

La lésion unilatérale partielle de la substance noire : Technique acquise chez le docteur Marc Savasta à Grenoble ; ce modèle est obtenu en injectant la 6-OHDA (Sigma), par stéréotaxie dans la partie latérale de la SNpc, aux coordonnées suivantes : A:+3mm, L:+2,4mm, V: -2, 9mm (par rapport à la ligne interaurale, d'après l'atlas de Paxinos et Watson., 1982), avec la barre des dents à -3.3 mm (technique décrite en détail dans l'article 1).

1.2 Lésions bilatérales

Afin de se rapprocher de la maladie humaine, nous souhaitons développer un modèle bilatéral. Pour des raisons de reproductibilité, nous n'avons pas essayé d'effectuer des lésions bilatérales partielles par injection de 6-OHDA dans la partie latérale de la SNpc. Dans un premier temps, nous avons tenté d'effectuer des lésions bilatérales par injection unique de 6-OHDA (adapté de Kirik et coll., 1998) dans le striatum de manière bilatérale aux coordonnées suivantes :

A:+1mm, L:+/- 3mm, V: -5mm (par rapport au bregma, d'après l'atlas de Paxinos et Watson., 1982), avec la barre des dents à 0 mm.

A la suite de ces opérations, la moitié des animaux sont morts (peut-être que des injections en plusieurs sites auraient diminué la mortalité).

Nous avons alors décidé d'utiliser un autre site : le FMT. La lésion bilatérale dans le FMT est considérée comme non viable (cf modèle 6-OHDA). En diminuant les doses injectées dans le FMT, nous avons mis au point un modèle bilatéral viable

(seulement 10 à 30 % de mortalité) qui regroupe un grand nombre de caractéristiques de la maladie humaine (article 2).

Les lésions partielles bilatérales (mises au point pendant ma thèse, article n°2) sont obtenues par deux injections stéréotaxiques de 6-OHDA (Sigma-Aldrich). Elles sont réalisées par hémisphère dans le FMT. Les rats sont placés sur un cadre stéréotaxique (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). La 6-OHDA est dissoute à la concentration de $1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ dans une solution de 0,9% NaCl 0,02% L-ascorbate (Sigma-Aldrich). Un volume de 1,5 μl de solution de 6-OHDA est injecté aux coordonnées suivantes (en mm, par rapport au bregma et à la dure-mère ; d'après l'atlas stéréotaxique de Paxinos et Watson, 1982) : antéro-postérieur, -4,0 ; latéral, $\pm 0,8$ (+ pour la droite) ; ventral, -8,0 et la barre des dents +3,4. Puis 1,9 μl de cette même solution sont injectés aux coordonnées suivantes (en mm, en référence au bregma et à la dure-mère) : antéro-postérieur, -4,4 ; latéral, $\pm 1,2$; ventral, -7,8 et la barre des dents -2,4.

2 Analyse comportementale

Le laboratoire possédait l'appareillage nécessaire pour effectuer le test du rotomètre (cf chapitre 2.3.2.4.3 de l'introduction). Ce test a été utilisé dans un premier temps pour évaluer la perte dopaminergique. Cependant, ces mouvements rotatoires sont assez éloignés de ce qui est observé chez l'humain où des anomalies motrices existent en l'absence de tout traitement pharmacologique. La pertinence de ce test pour évaluer des récupérations motrices sous greffes a été contestée, et le traitement pharmacologique entraîne un « priming » pouvant perturber l'analyse de la survenue des dyskinésies. C'est pourquoi d'autres tests ont été mis au point au fur et à mesure de cette thèse, à partir des données de la littérature. Les facultés motrices

des rats ont été observées par différents tests comportementaux basés sur des réactions innées et involontaires, ne nécessitant pas l'utilisation de substances pharmacologiques (le stepping-test, le rotarod, le V-Ball test). La plupart des tests utilisés sont présentés dans le chapitre 4.2 des résultats.

3 Marquage immunohistochimique (principe)

Des sections coronales (40µm d'épaisseur) sériées au niveau du striatum et de la substance noire sont effectuées à l'aide d'un cryostat à -20°C (série CM 3050 Leica Microsystems AG, Wetzlar, Allemagne) et placées dans des plaques 12 puits contenant du PBS à 4°C en attendant leur traitement par immunohistochimie.

A partir des coupes, différents marquages immunohistochimiques sont pratiqués comme l'immunohistochimie de la tyrosine-hydroxylase (TH) sur coupe flottante : l'identification des neurones dopaminergiques repose sur leur contenu en TH (enzyme intervenant dans la biosynthèse de la dopamine). Il est possible de la mettre en évidence par immunohistochimie, notamment par la méthode indirecte comportant deux étapes.

Dans un premier temps, les coupes flottantes de cerveaux sont incubées la nuit à +4°C sous agitation, en présence de l'anticorps anti-TH (Institut Jacques Boy S.A) produit chez le lapin (dilué au 1/10000 pour les coupes au niveau de la substance noire, et au 1/5000 pour les coupes au niveau du striatum, dans du tampon Tris / NaCl 0,1 M pH 7,4 / Triton 0,3% / NGS 1 %).

Dans un deuxième temps, les coupes de cerveaux sont incubées en présence de l'anticorps secondaire (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., fabriqué chez l'âne et dirigé contre les immunoglobulines de lapin), dilué au 1/500 pour les

coupes au niveau de la substance noire et du striatum dans du tampon Tris / NaCl 0,1 M pH 7,4 / Triton 0,3% / NGS 1%; révélé à l'aide du kit DAB de Vector utilisant la diaminobenzidine qui assure la formation d'un précipité marron (La méthode est détaillée dans l'article 1). D'autres immunohistochimies ont été réalisées, le tableau récapitulatif des anticorps est dans la partie 4.2 des résultats.

4 Méthodologies d'analyse quantitative de la perte neuronale

4.1 Méthode (décrite par Sauer et Oertel)

Dans un premier temps, le laboratoire ne disposait pas d'un système

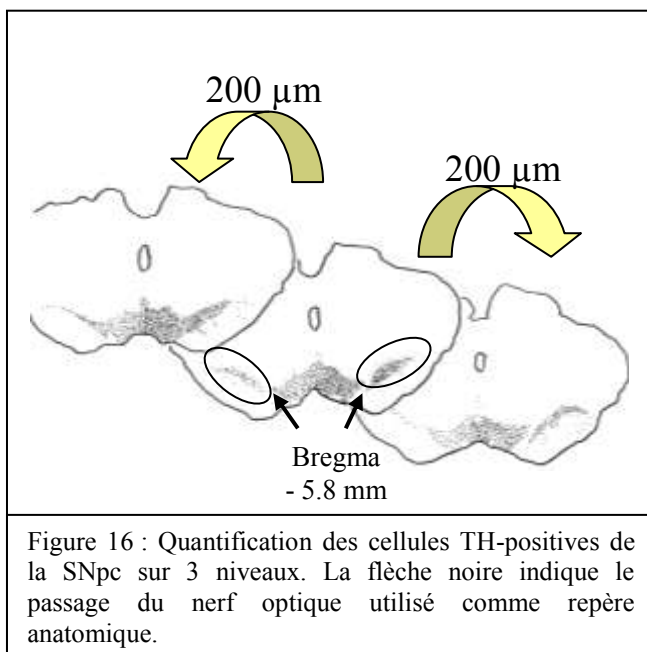


Figure 16 : Quantification des cellules TH-positives de la SNpc sur 3 niveaux. La flèche noire indique le passage du nerf optique utilisé comme repère anatomique.

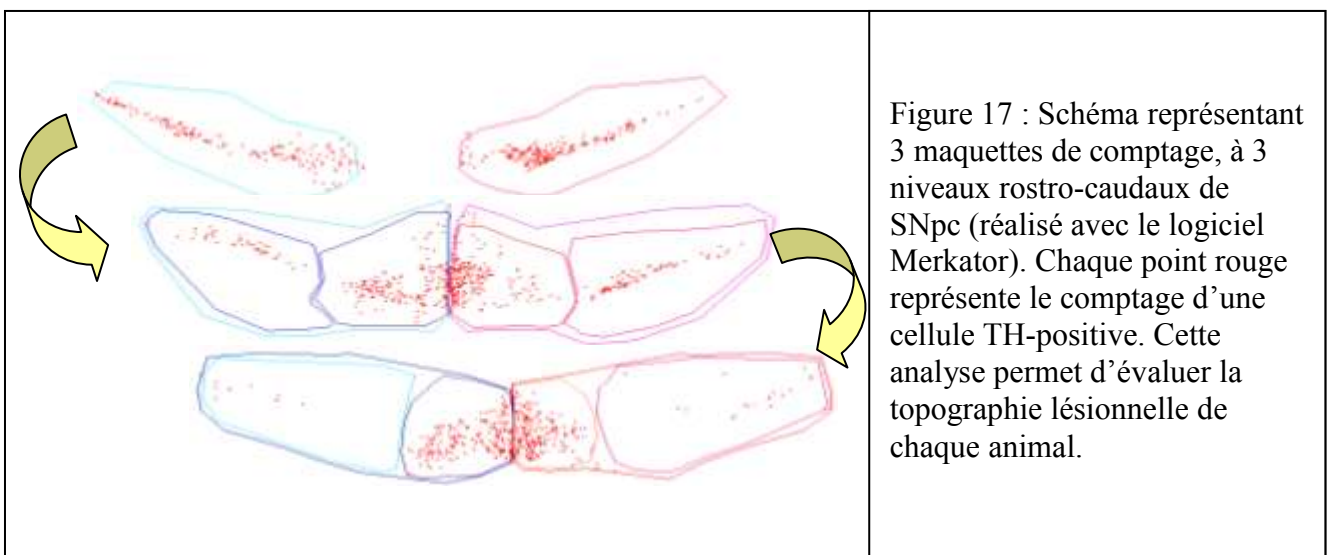
d'analyse d'image. La quantification de la perte neuronale a été effectuée en utilisant une technique décrite par Sauer et Oertel (1992). Brièvement, les cellules TH-positives sont comptées sur 3 niveaux de SNpc, une coupe au niveau de l'émergence du nerf III et une coupe environ 200 μm plus rostrale et une coupe 200μm plus caudale par rapport à ce repère

anatomique. Seulement les neurones les plus visibles sont comptabilisés (figure 16).

La perte neuronale est exprimée en pourcentage de cellules présentes dans la SNpc ipsilatérale à la lésion par rapport aux cellules TH-positives présentes dans la SNpc contralatérale (la méthode est expliquée en détail dans l'article 1).

4.2 Quantification en utilisant un système de comptage

Dans un deuxième temps, le laboratoire a acquis un système d'analyse d'image et de quantification : Merkator (Explora Nova, La Rochelle, France). Le nombre de neurones TH-positifs au niveau de la SNpc a été évalué sur 13 niveaux de coupes, couvrant la totalité de la structure. Seules les cellules avec un noyau clairement visible ont été comptabilisées (figure 17). L'erreur de comptage a été prise en compte en utilisant la formule d'Abercrombie et le nombre total de cellules dans la structure a été évalué en utilisant la formule de Konigsmark. (Les détails de la méthode et des formules sont décrits dans l'article 2)



5 Extaction d'ARN et rétrotranscription

Le prélèvement des échantillons cérébraux (Striatum et mésencéphale ventral) est standardisé en utilisant une « brain matrix » (WPI, Sarasota, FL, USA rat 300g-600g), permettant d'effectuer des tranches coronales de cerveau de 2mm d'épaisseur toujours aux mêmes niveaux rostro-caudaux. Une tranche est ainsi obtenue au niveau du striatum, et une autre au niveau de la SNpc. Les échantillons

de striatum et de mésencéphales ventraux sont prélevés en utilisant des « punchs de biopsy » stériles (Stiefel laboratories, Nanterre, France) de 4mm et 3 mm de diamètre respectivement. Les échantillons sont ensuite plongés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C (cf méthode article 3).

Les fragments de cerveaux sont placés dans des tubes contenant du TriZol® (Life Technologies, 1 ml par prélèvement) pour homogénéisation en utilisant une seringue d'1ml, et une aiguille (Terumo, 0,9 x 25 mm, Louvain, Belgique) (une trentaine de « va et vient »). Ils sont alors précipités à température ambiante pendant 15 minutes. Après séparation, la phase aqueuse contenant les ARN totaux est récupérée. Les ARNm sont précipités dans l'isopropanol, récupérés par centrifugation, puis le culot est lavé à l'éthanol. Après séchage, l'ARN est resuspendu dans de l'eau pour préparation injectable et la concentration est évaluée par la mesure de l'absorbance à 260 nm, puis ajustée à 1 µg/µl. L'intégrité de l'ARN et l'absence d'ADN génomique sont vérifiées par fractionnement des échantillons par électrophorèse sur gels dénaturants, qui, après marquage au bromure d'éthidium et analyse au densitomètre, nous donne le rapport des quantités d'ARN ribosomaux 28S sur 18S, qui reflètent la qualité des ARN totaux (L'intensité de la bande de 28S devant être deux fois supérieure à celle de 18S).

Les ARNm sont rétrotranscrits en utilisant une première amorce désoxyribonucléique d'oligo dT (18-25 mers, à 10 mM en concentration finale) qui s'hybride avec la queue polyadénosylée des ARNm. Dix microgrammes d'ARN sont ajoutés à 1µl d'oligo-dT, à du dithiothréitol à 8 mM en concentration finale, et avec des dNTP (désoxynucléotides-triphosphates) à 0.5 mM en concentration finale, dans un volume final de 17 µl, et chauffé pendant 10 minutes à 70°C pour permettre la dénaturation des acides nucléiques. Dans l'étape suivante, 1 µl de RNAsine (40U/ml)

et 1 μ l d'enzyme reverse transcriptase (Mouse Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase, 200U/ml) sont ajoutés aux échantillons dans un volume final de 25 μ l de 50 mM Tris, pH 8.3, 3 mM $MgCl_2$, 125 mM KCl. Après 1 heure d'incubation à 42°C (synthèse des acides désoxyribonucléiques), on ajoute de 75 μ l d'eau pour préparation injectables, puis l'ADN complémentaire (ADNc) est conservé à -80°C.

6 Analyse semi-quantitative par PCR en temps réel (TaqMan®)

2 techniques différentes ont été utilisées :

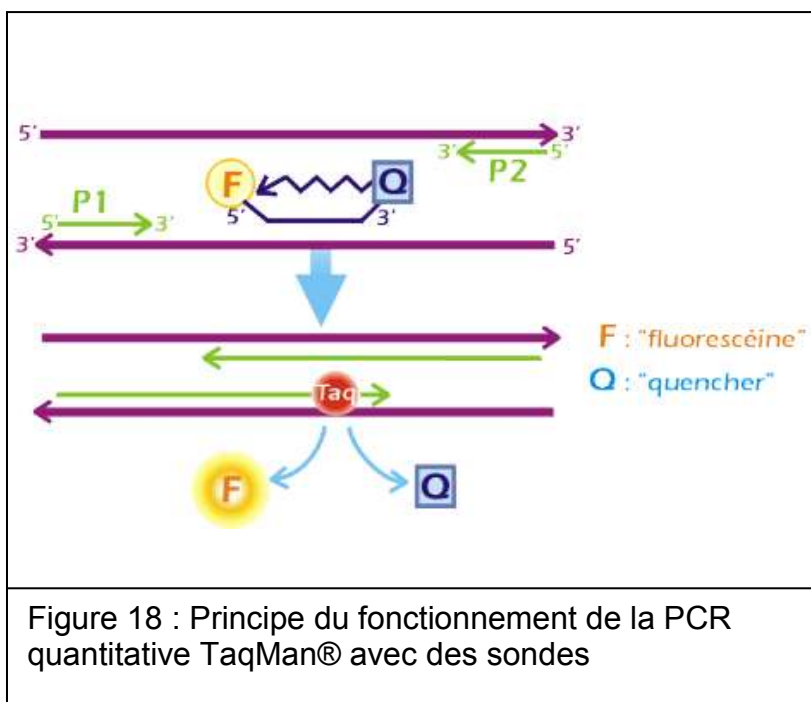
1) La PCR quantitative TaqMan® avec du SyberGreen : permet la détection directe des produits de PCR par la mesure de l'augmentation progressive de la fluorescence émise par l'attache du fluorochrome, le SYBER Green, au cours de la synthèse des doubles brins d'ADN.

2) La PCR quantitative TaqMan® avec des sondes commerciales (Applied

Biosystem) (figure 18) :

P1 et P2 sont les amorces utilisées pour la PCR. La sonde reporter est marquée à la fluorescéine en 5' (F) et le quencher est marqué à la rhodamine (Q) en 3'.

Pendant la PCR, la sonde se fixe sur la cible. La



Taq DNA polymérase, par son activité nucléastique 5', clive la sonde reporter et libère la molécule de fluorescéine qui, séparée du quencher recouvre sa propriété de

fluorescence. La fluorescence émise est proportionnelle au nombre de molécules cibles de départ. La cinétique de développement de la fluorescence peut être suivie en temps réel au cours de la réaction d'amplification.

Les détails de la méthode sont présentés dans l'article 3.

RESULTATS

1 Développement d'un modèle de rat présentant des dyskinésies

1.1 Travaux préliminaires, développement d'un modèle unilatéral et validation immunohistochimique

1.1.1 Présentation

Le but de ce premier travail était de mettre au point un modèle de rat parkinsonien unilatéral proche de la maladie humaine sur le plan histologique, comportemental, et surtout développant des dyskinésies lors du traitement par la L-DOPA. A cet effet, nous avons étudié 2 types de lésions différentes :

- 1- 4 rats lésés de manière unilatérale totale obtenus par 2 injections de 6 OHDA dans le faisceau médian du télencéphale (FMT).
- 2- 12 rats lésés de manière unilatérale partielle obtenus par injection de doses croissantes de 6-OHDA directement au niveau de la SNpc (1,5 µg, 3 µg et 6µg) ; 4 rats pour chaque dose.

Dans ces 2 cas de figures, nous avons recherché si un traitement par la L-DOPA provoquait des mouvements anormaux involontaires (ressemblant aux dyskinésies), et nous avons corrélié l'apparition de tels mouvements avec le niveau de perte dopaminergique quantifié par comptage au niveau de la substance noire pars compacta.

1.1.2 Principaux résultats

1.1.2.1 Aspects comportementaux

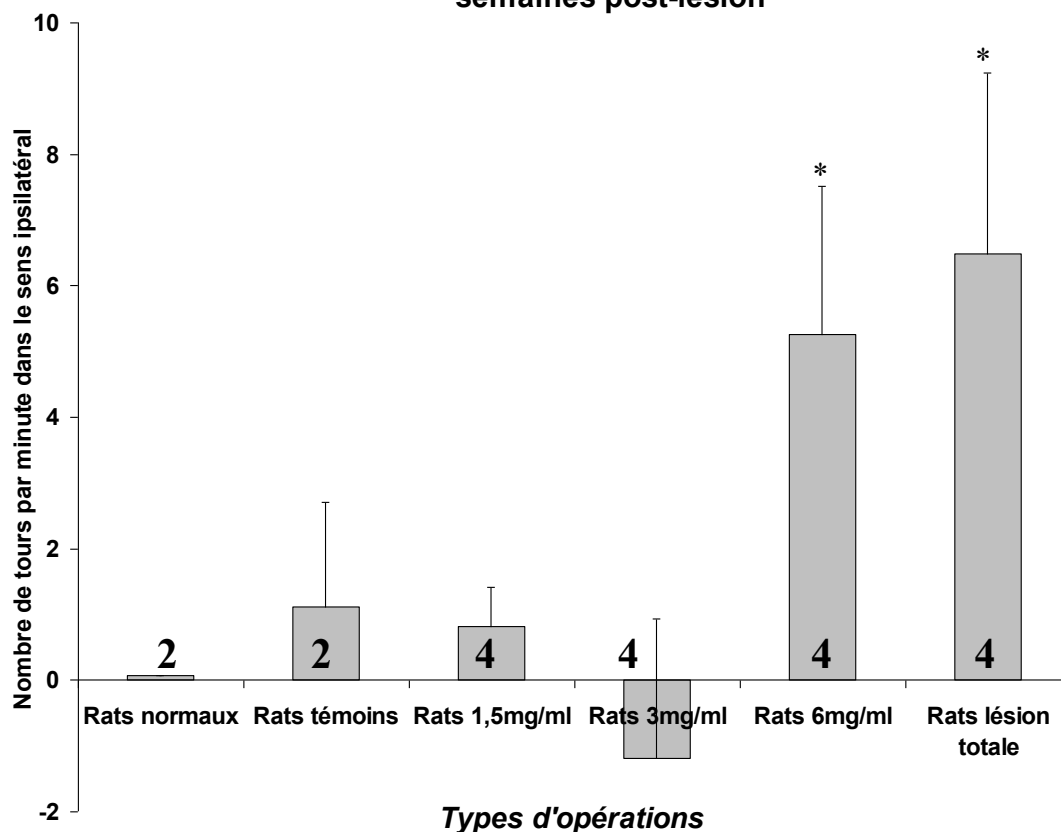
Nous n'avons pas observé de troubles moteurs spontanés visibles chez les rats lésés de manière totale ou de manière partielle. Il est probable que l'utilisation de

tests comportementaux appropriés (utilisés par la suite durant la thèse) aurait pu montrer une différence entre ces différents types de lésions.

Les 4 animaux lésés de manière totale ont développé un important comportement de rotation sous amphétamines (Graphe 1) du côté ipsilatéral à la lésion (environ 6 à 7 tours par minute du côté ipsilatéral, quantifiés par un rotomètre), alors que les 2 animaux témoins n'ont pratiquement aucune activité (décelable par ce test) même sous amphétamines. Le comportement de rotation est identique pour ce même lot de rats à 10 jours et à 30 jours post-opératoire (données non montrées). Le nombre de rotations chez les rats lésés est significativement différent de celui des rats témoins ($p < 0.05$).

Les histogrammes ci-dessous (Graphe 1) montrent les résultats des tests au rotomètre, effectués sous amphétamines, trois semaines après la lésion pour chacune des doses testées (4 rats par dose). Les rats normaux et les rats témoins (opérés de la même manière, mais avec injection du véhicule) servent de témoins

Graphe 1: Tests au rotomètre sous amphétamines après 3 semaines post-lésion



négatifs. Les rats ayant subi une lésion totale (décrits précédemment) servent de témoins positifs pour ce test. Il n'y a pas de différence comportementale significative décelable par ce test, entre les rats témoins et les rats soumis à des doses de 6-OHDA de 1.5 et 3 μg ($p \gg 0.05$). En revanche, pour des doses de 6-OHDA de 6 μg , il y a un comportement rotatoire significativement différent du témoin ($p < 0.05$) et comparable aux mouvements rotatoires observés chez les rats avec une lésion totale. (Tests statistiques : Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn)

Traitement des rats par la L-DOPA et observation comportementale

Deux mois après l'opération, les animaux lésés encore en vie sont traités par voie orale avec de la L-DOPA (100 mg/kg de Sinemet® 250mg dilué dans de l'eau ; (cf méthode de l'article n°1). Le but de cette expérience était d'induire chez ces rats des mouvements anormaux involontaires (MAIs) consécutifs au traitement.

Après une semaine de traitement, les rats lésés de manière totale ont développé les mouvements anormaux attendus, et décrits par quatre critères (Cenci et coll., 1998) auxquels ont été associés des scores allant de 0 à 4 (cf méthode article 1):

1- **"Comportement tourneur"** → score 4

2- **Dystonie axiale** : → score 4

3- **Dyskinésie orolinguale** ÷ → score 0

4- **Mouvements dyskinétiques de la patte avant controlatérale** : score 2 à 3

Ces rats ne développent pas de dyskinésies orolinguales, mais développent les trois autres types de mouvements anormaux. Par contre, même après 3 mois de traitement (avec doublement de la dose au deuxième mois), les rats ayant une lésion

partielle n'ont jamais développé de mouvements anormaux, et ce quelle que soit la dose de 6-OHDA injectée.

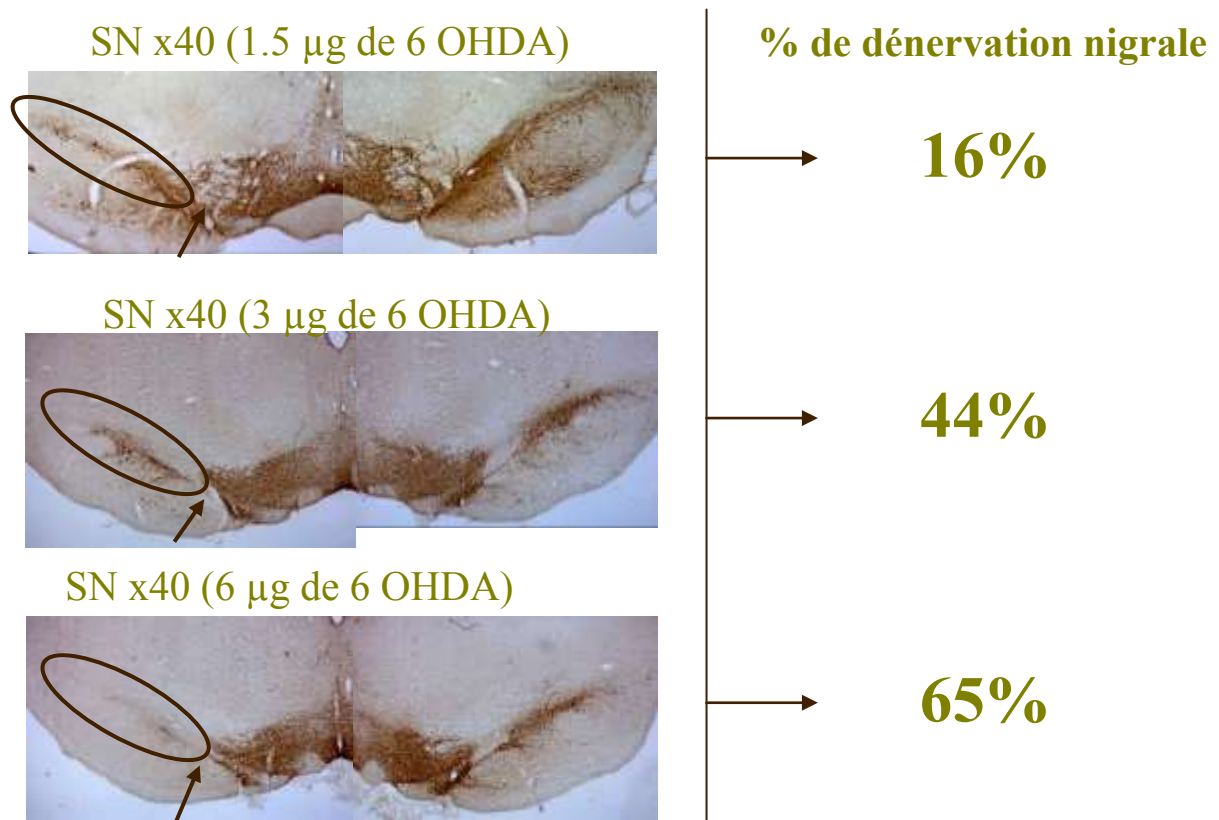
1.1.2.2 Aspects histologiques

La **figure 16** montre qu'il ne reste pratiquement plus de marquage immunohistochimique des neurones dopaminergiques au niveau de la substance noire du côté ipsilatéral à la lésion.

Au niveau de la substance noire, le marquage immunohistochimique anti-TH a disparu pour les rats lésés de manière totale, y compris dans l'aire tegmentale ventrale (ATV) (Figure 19). Les rats lésés de manière partielle ont une lésion dans la partie latérale de la substance noire avec l'ATV relativement préservée (figure 17). Dans ces derniers, la zone dénervée est d'autant plus étendue que la dose de 6-OHDA utilisée était élevée (figure 20 et tableau 4). De même, au niveau du striatum, l'immunomarquage à la TH est d'autant plus diminué que la dose de 6-OHDA est importante (images non montrées). La partie ventro-médiane est, dans tous les cas, la région la mieux préservée.

Figure 19 : Lésion totale dans la SNpc (x40)



Figure 20' : Lésions partielles (avec différentes doses)

Légendes : Immunohistochimies anti-Tyrosine hydroxylase (TH), en coupes flottantes, effectuées sur des coupes coronales de 40µm passant au niveau de la SNpc (Méthode détaillé dans l'Article n°1). Grossissement x4.

Tableau 4 : Récapitulatif des comptages

	Moyenne du nombre de neurones DA présents dans 3 coupes de SN		Perte neuronale (en % par rapport au côté controlatéral)
	Côté Ipsilatéral	Côté controlatéral	
Rats témoins	276	292	6%
Rats LP (1.5 mg/ ml)	276	329	16%
Rats LP (3 mg/ ml)	184.2	329.3	44%
Rats LP (6 mg/ ml)	106.2	300	65%
Rats LT dans le FMT	Non quantifié	Non quantifié	Environ 99%

Effectifs : 2 cerveaux comptés par ligne.

Au regard de ce tableau, on observe donc un effet de la quantité de 6 OHDA injectée sur la dénervation nigrale. Cette dénervation va jusqu'à 65 % pour une dose

de 6 µg de 6-OHDA, par rapport au côté controlatéral. Le comptage a été effectué sur 3 coupes séparées l'une de l'autre d'environ 200µm (cette technique est détaillée dans la méthode du premier article).

1.1.3 Conclusion

Les animaux ayant subi une lésion totale, ont (sous amphétamines) un comportement tourneur au rotomètre (6 à 7 tours / minute) correspondant à une lésion massive du faisceau nigro-strié. En revanche, ces animaux n'ont pas de comportement moteur anormal spontané (c'est à dire sans amphétamines). Ce test du rotomètre constitue un moyen assez simple, et non invalidant pour le rat, d'évaluer la lésion de la voie nigro-striée. Cependant, le fait d'injecter des amphétamines modifie l'expression des "gènes précoces" tels que le proto-oncogène c-fos (Graybiel et coll., 1990b ; Day et coll., 2001 ; Cenci et coll., 1992) ce qui contribue à modifier la plasticité cérébrale et peut-être la susceptibilité à développer des dyskinésies. D'autres tests comportementaux, évitant l'injection d'amphétamines, seraient intéressants à utiliser pour évaluer cette lésion, comme le test de l'escalier (staircase test) qui mesure l'adresse du mouvement des pattes avant (Montoya et coll., 1990), le stepping- test, le rotarod ou l'open-field.

Sous traitement par la L-DOPA, ces animaux lésés de manière totale développent des mouvements anormaux involontaires (MAIs) qui ressemblent, par certains points, aux dyskinésies observées chez l'homme. Enfin, l'étude immunohistochimique de la TH confirme la lésion unilatérale totale de la SNpc de ces animaux. Ce caractère total et unilatéral de la lésion est différent des lésions de la maladie humaine ; c'est pourquoi un modèle plus partiel serait préférable.

Les animaux opérés avec différentes doses de 6-OHDA dans la substance noire (lésion partielle) n'ont pas de comportement spontané différent des rats

normaux, quelle que soit la dose utilisée. Par contre, le test au rotomètre montre qu'il existe **une valeur seuil** de lésion de la voie nigro-striée par injection de 6-OHDA dans la substance noire, susceptible de faire passer un rat d'un stade asymptomatique à un stade symptomatique décelable (sous amphétamines) au rotomètre. Cependant, même si les rats opérés avec une dose de 6 µg de 6-OHDA ont un comportement tourneur au rotomètre similaire à celui des rats présentant une lésion totale, cette lésion n'est pas suffisante pour induire des MAIs suite au traitement par la L-DOPA, comme il l'a été observé pour les rats avec une lésion totale. La valeur seuil entre la phase asymptomatique et la phase symptomatique (au rotomètre après injection d'amphétamines) se situe entre 3 µg et 6 µg de 6-OHDA injectée dans la substance noire. L'analyse immunohistochimique fait apparaître un effet dose de l'injection de 6-OHDA, dans la SN sur la perte de neurones TH-positifs. D'après les études quantitatives, la valeur seuil (entre la phase asymptomatique et symptomatique, décelable au rotomètre) serait aux alentours de 50 % de dénervation. Ces résultats suggèrent qu'il existe différents stades d'expression clinique de la maladie, dans ce modèle de rat, directement en relation avec l'importance de la lésion de la voie nigro-striée :

- 1- Lésion < 50% —————→ • Phase asymptomatique sous amphétamines
(au rotomètre)
- Pas de MAIs provoqués par le traitement par L-DOPA
- 2- 50 % < lésion < X% —————→ • Phase symptomatique sous amphétamines
(au rotomètre)
- Pas de MAIs provoqués par le traitement par L-DOPA
- 3- Lésion > X% —————→ • Phase symptomatique sous amphétamines
(au rotomètre)
- MAIs provoqués par le traitement par L-DOPA

1.2 Caractérisation des dyskinésies sous L-DOPA sur un modèle unilatéral partiel de la maladie de Parkinson

1.2.1 Présentation

Afin de déterminer cette valeur seuil de lésion nigrale (X %, probablement supérieure à 60 %, d'après les premiers résultats quantitatifs), à partir de laquelle le traitement par la L-DOPA est capable de provoquer des dyskinésies, une autre série de rats a été opérée aux mêmes coordonnées, avec des doses plus fortes de 6-OHDA (6 µg, 12 µg et 24 µg) ; tout en prenant le risque qu'à partir d'une certaine dose, le produit aurait peut-être du mal à diffuser et ne modifierait pas la lésion. L'ensemble des résultats préliminaires, aux différentes doses de 6-OHDA nous permettra d'évaluer la valeur seuil du déclenchement des mouvements anormaux involontaires. De plus, ces expériences vont nous fournir un panel de rats possédant

des lésions partielles unilatérales plus ou moins importantes, en quelque sorte l'équivalent de différents stades de la maladie chez l'homme.

1.2.2 Principaux résultats

Ainsi, cette expérience nous montre que l'apparition des dyskinésies sur un modèle unilatéral de la maladie est corrélée avec le degré de perte de neurones dopaminergiques dès lors qu'une valeur seuil d'environ 95% de perte dopaminergique est atteinte. Cette expérience répond à la question posée par l'expérience préliminaire.

Ces résultats expérimentaux sur ce modèle simple, unilatéral de la maladie, nous montrent que l'importance de la dénervation doit probablement jouer un rôle dans le développement des dyskinésies induites par la L-DOPA. Dans la maladie de Parkinson, les dyskinésies apparaissent habituellement après plusieurs années de traitement quand la lésion dopaminergique est plus sévère qu'au début de la maladie, mais dans certains cas elles ont été observées à un stade précoce (CAD quelques jours de traitement) chez les patients avec une dégénérescence nigrale sévère due à une intoxication massive au MPTP (Davis et coll., 1979 ; Tetrad et Langston 1989). De plus, les dyskinésies n'ont jamais été observées chez des patients non parkinsoniens, même avec des fortes doses de L-DOPA (Marsden et Parkes, 1977). Ce facteur n'est probablement pas exclusif. Certains patients ayant des pertes dopaminergiques sévères dans la SNpc, comme l'attestait la sévérité de leurs symptômes moteurs quand le traitement était arrêté pendant quelques heures, ne développaient pas de dyskinésies même avec une forte dose et un traitement prolongé de L-DOPA (Marsden et Parkes, 1977 ; Schrag et Quinn., 2000). Des lésions associées à un déficit dopaminergique nigro-striatal peuvent en être responsables, comme c'est le cas dans d'autres syndromes parkinsoniens, comme

« l'atrophie multiple systématisée » ou la paralysie supranucléaire progressive, dans lesquelles les dyskinésies induites par la L-DOPA sont rarement observées.

Article n°1

- Paillé V, Brachet P and Damier P. *Role of nigral lesion in the genesis of dyskinesias in a rat model of Parkinson's disease*. Neuroreport 2004 Mar 1;15(3):561-4.

2 Développement d'un modèle animal le plus proche possible de la maladie de Parkinson humaine

2.1 Présentation

La plupart des modèles de rat de la maladie de Parkinson sont des modèles unilatéraux (pour revue Schwarting et Huston., 1996a ; Schwarting et Huston 1996b). Ces modèles ont été très utiles dans la recherche préclinique. Cependant, plusieurs arguments plaident pour l'utilisation préférentielle de modèles bilatéraux. Premièrement, la maladie humaine affecte les deux hémisphères (même si la lésion est souvent asymétrique). Ensuite, il ne subsiste pas de côté intact qui puisse compenser le côté lésé.

Le but de cette étude était de développer un modèle le plus proche possible de la maladie humaine, respectant les caractéristiques suivantes : La lésion doit être bilatérale, ces animaux doivent présenter une symptomatologie motrice réversible sous L-DOPA quantifiables par des tests spécifiques, développer des dyskinésies sous traitement par la L-DOPA et enfin avoir une topographie lésionnelle similaire à celle observée chez l'Homme. Après avoir essayé différents types de lésions bilatérales (Striatum, SN et FMT), le modèle par injection de doses modérées de 6-OHDA dans le FMT s'est avéré être le modèle le plus satisfaisant.

2.2 Principaux résultats

Ces animaux présentent des caractéristiques qu'il est possible de rapprocher de la maladie humaine :

- 1) des troubles moteurs des membres mis en évidence par le stepping-test.
- 2) une récupération totale des troubles moteurs après traitement oral par la L-DOPA (2 administrations par jour).

3) le développement, pour la majorité d'entre eux, de dyskinésies quantifiables en utilisant l'échelle des mouvements anormaux involontaires (MAIs) (Paille et coll., soumis).

4) Sur le plan histologique, ces rats porteurs d'une lésion bilatérale présentent une destruction partielle des neurones DA de la SNpc avec une localisation postéro-latérale et une préservation des neurones DA de l'aire tegmentale ventrale (ATV), quantifiée par stéréologie.

De plus, les corrélations effectuées au cours de cette étude nous montrent que le stepping-test est prédictif du niveau lésionnel et qu'il nous permet de sélectionner les animaux ayant la plus grande probabilité de développer des mouvements anormaux involontaires sous traitement par la L-DOPA.

Ce modèle représente donc un des modèles rats les plus proches, sur le plan clinique et histologique, de la maladie de Parkinson. De plus le stepping-test nous fournit un paramètre « clinique » de la sévérité lésionnelle et de la réponse comportementale à la L-DOPA. Ce modèle constitue ainsi un outil de choix pour l'étude de nouvelles stratégies restauratrices.

Article n°2

- Paillé V, Lescaudron L, Brachet P and Damier P. *New rat model of Parkinson's disease with bilateral nigral lesion, Motor Abnormalities Reversible with Levodopa and Dyskinesias* (soumis).

3 Caractérisation moléculaire de ce modèle

3.1 Présentation

Après avoir caractérisé le modèle bilatéral sur le plan comportemental et histologique (quantification de la perte neuronale par comptage), nous avons étudié sur le plan moléculaire l'expression de marqueurs inflammatoires et neurotrophiques, dans le striatum et le mésencéphale ventral (MV), l'effet de la lésion bilatérale. En effet, la mort des neurones DA dans le modèle de rat 6-OHDA, est provoquée par un stress oxydatif. Une activation microgiale a été décrite dans la voie nigrostriée (cf chapitre 2.3.2.4.1).

Afin de mieux comprendre le statut immunologique et neurotrophique de ce modèle, dans le but d'évaluer des thérapies cellulaires, nous avons étudié la cinétique d'expression d'ARNm de facteurs trophiques (GDNF, BDNF et NT3) et de marqueurs de l'inflammation (CD11b, $\text{TNF}\alpha$ et iNOS) sur 40 rats (20 rats shams et 20 rats lésés de manière bilatérale). Nous avons utilisé pour cela une technique de RT-PCR quantitative en temps réel (TAQMAN®) sur des échantillons de MV et de striatum à différents temps (1 jour, 1, 2, 3, et 4 semaines après les injections).

3.2 Principaux résultats

L'analyse de cette expérience, initialement destinée uniquement à la caractérisation du contexte immunologique et trophique de ce modèle, a apporté des informations potentiellement intéressantes sur la pathogénie de la maladie.

L'injection de 6-OHDA et du véhicule (rats shams) dans le FMT s'accompagne de modifications complexes de l'expression de différents marqueurs de l'inflammation et de différents facteurs neurotrophiques tant au niveau du MV que du

striatum. L'essentiel des modifications observées les 3 premières semaines après l'injection semble être le fait du traumatisme physique de l'injection, les modifications plus spécifiquement liées à la 6-OHDA n'apparaissent qu'à partir de 3 semaines après l'injection.

L'expression de iNOS qui est transitoire chez les rats shams (chute après 2 semaines) atteint un pic à 3 semaines uniquement chez les rats lésés. Cette expression de iNOS transitoire correspond à l'activation de la voie du NO de la microglie susceptible d'exercer son effet délétère sur les neurones environnants. Après 4 semaines, et uniquement chez les rats lésés, est observée une augmentation de l'expression de CD11b, à la fois dans le MV et le striatum, pouvant correspondre à une infiltration microgliale et/ou macrophagique. En parallèle, à la quatrième semaine, dans le MV, il y a une augmentation significative de l'expression de GDNF uniquement chez les rats 6-OHDA. Ces expressions en parallèle de CD11b et de GDNF montrent que la microglie pourrait avoir un effet protecteur (directe ou indirecte) en stimulant l'expression de GDNF. Cet effet est maximal suite à une dégénérescence induite par un neurotoxique 4 semaines après l'injection dans notre modèle.

Ces données nous donnent des informations intéressantes sur la cinétique d'expression de l'inflammation et des facteurs trophiques suite à une lésion bilatérale du faisceau nigro-strié. Les expressions similaires des gènes, de l'inflammation et des facteurs neurotrophiques les 3 premières semaines, chez les rats shams et les rats lésés, suggèrent que l'altération de la transmission dopaminergique, mise en évidence par les tests comportementaux uniquement chez les rats 6-OHDA, pourrait être indépendante de la réaction microgliale. La microglie agirait plutôt de manière

tardive 4 semaines après l'opération, en réponse à une mort neuronale importante. Son rôle serait secondaire et peut être même neuroprotecteur comme en témoigne la présence concomitante d'ARNm du GDNF et de CD11b uniquement chez les rats lésés à la 6-OHDA.

Article n°3

- Paillé V, Melchior B, Henry V, Thinard R, Louvet C, Lescaudron L, Brachet P and Damier P. *Temporal expression of trophic factor and inflammation marker mRNA in a bilateral rat model of Parkinson's disease* (en préparation).

4 Optimisation du rétablissement dopaminergique

4.1 Principe

Concernant les greffes striatales, des résultats positifs indiscutables ont été obtenus chez les patients (Kordower et coll., 1995 ; Peschanski et coll., 1994). Néanmoins, si la survie des greffons semble actuellement correcte, un grand nombre d'inconnues persistent (site optimal, quantité de cellules à greffer). De plus, 2 études américaines récentes (Freed et coll., 2001 ; Olanow et coll., 2003) menées en double aveugle contre placebo rapportent l'apparition de dyskinésies sous greffes de patients sevrés en L-DOPA, ainsi qu'une faible récupération motrice. Ceci montre encore que le rétablissement dopaminergique n'est probablement pas optimal. De plus, la détérioration des comportements moteurs, quelques semaines après l'arrêt du traitement immunosuppresseur, montre que le rejet n'est pas négligeable et peut intervenir dans l'apparition de certains effets secondaires (pour revue Winkler et coll., 2005).

Avant d'envisager l'utilisation de greffes (cellules fœtales, mais aussi dans les années à venir, allogreffes ou greffes de cellules souches) pour traiter des patients atteints de maladie de Parkinson, ces inconnues doivent impérativement être précisées.

L'objectif de cette étude était de rechercher la méthode la plus "physiologique" de rétablissement de la transmission dopaminergique (DA). Pour ce faire, nous avons voulu comparer les effets cliniques (correction du syndrome parkinsonien, développement d'une hypersensibilité à la L-DOPA) avec la qualité du greffon (évaluée par immunohistochimie), de 3 modalités de "réparation dopaminergique" :

- 1) Traitement par L-DOPA oral
- 2) Greffes de cellules dopaminergiques dans le striatum
- 3) Greffes nigrales et striatales

sur le modèle de "rat parkinsonien" précédemment développé.

Cette étude devrait permettre de fournir deux types d'indications concernant la maladie de Parkinson et son traitement :

1) Informations de nature physiopathologique. L'étude devrait aider à mieux comprendre les mécanismes à l'origine des complications du traitement dopaminergique (en particulier l'hypersensibilité que représentent les dyskinésies) en donnant des informations sur le rôle respectif de la dopamine nigrale, striatale, comparativement à son apport diffus (et « pulsatile ») par la L-DOPA orale. Ces indications pourraient être utiles pour améliorer certaines options de traitement médicamenteux des patients (recherche d'agonistes ou autres agents pharmacologiques ayant une action spécifique sur les récepteurs dopaminergiques de la SN ou du striatum).

2) Précision sur les sites optimaux de greffes neuronales dopaminergiques (cellules fœtales mais aussi allogreffe ou cellules souches) dans l'optique du développement de ce type de traitement dans la maladie de Parkinson.

4.2 Méthodes

4.2.1 Animaux

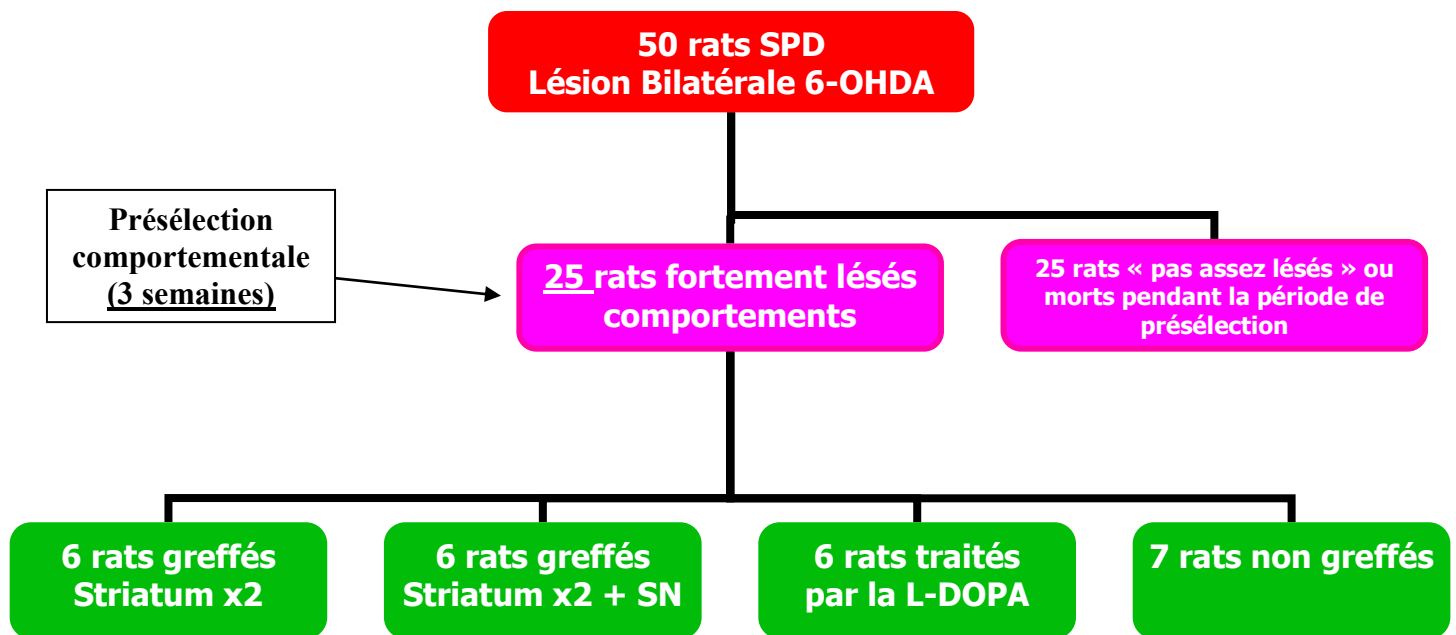
Les études sont réalisées sur 50 rats mâles Sprague-Dawley (SPD) d'environ 250g, maintenus dans une pièce à 22°C avec une alternance lumière obscurité de 12h et avec libre accès à la nourriture (*ad libitum*).

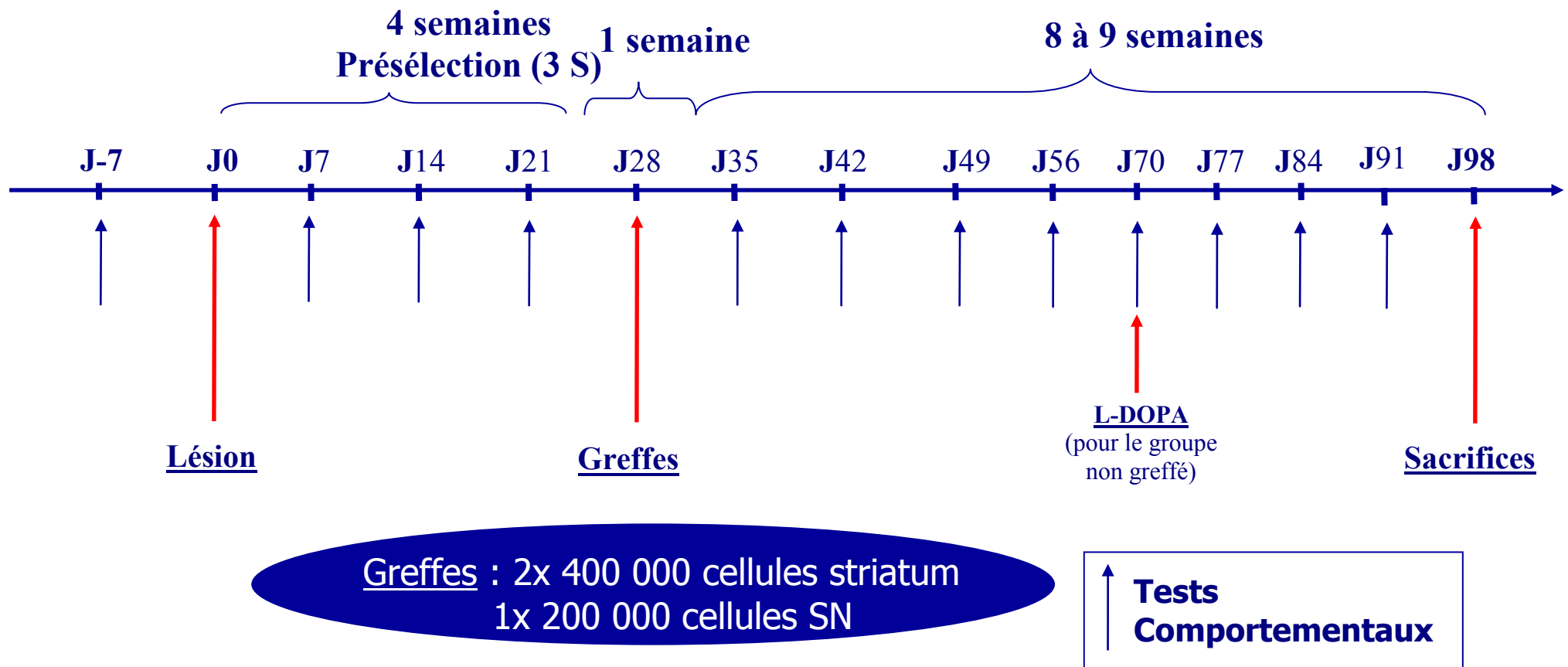
Les lésions partielles bilatérales (mises au point pendant ma thèse, article n°2) sont obtenues par deux injections stéréotaxiques de 6-OHDA (Sigma-Aldrich). Elles sont réalisées par hémisphère dans le faisceau médian du télencéphale (FMT). Les rats sont placés sur un cadre stéréotaxique (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). La 6-OHDA est dissoute à la concentration de $1,5\text{mg.ml}^{-1}$ dans une solution de 0,9% NaCl 0,02% L-ascorbate (Sigma-Aldrich). Un volume de $1,5\mu\text{l}$ de solution de 6-OHDA est injecté aux coordonnées suivantes (en mm, par rapport au bregma et à la dure-mère ; d'après l'atlas stéréotaxique de Paxinos et Watson, 1982) : antéro-postérieur, -4,0 ; latéral, $\pm 0,8$ (+ pour la droite) ; ventral, -8,0 et la barre des dents +3,4. Puis $1,9\mu\text{l}$ de la même solution sont injectés aux coordonnées suivantes (en mm, en référence au bregma et à la dure-mère) : antéro-postérieur, -4,4 ; latéral, $\pm 1,2$; ventral, -7,8 et la barre des dents -2,4.

4.2.1.1 Répartition des animaux dans les différents lots de traitement

Un effectif de 50 rats est lésé de manière bilatérale. Après les 3 semaines de présélection comportementale, 25 rats sont conservés. Ces animaux sont répartis en 4 groupes de 6 ou 7 animaux. Le premier groupe sert de témoin (sham), le second est traité par la L-DOPA, le troisième reçoit des greffes striatales, le quatrième reçoit des greffes striatales et nigrales.

Synopsis de l'étude



Décours temporel :

4.2.2 Traitements

Avant la réalisation des traitements, une **présélection comportementale** est effectuée sur les rats lésés, pendant une période de 3 semaines suivant l'opération. Seul les rats ayant un score au stepping-test faible, sont inclus dans l'étude. D'après les résultats précédents, la présélection comportementale nous permet ainsi de trier les rats lésés qui auront à peu près 80 à 90% de risques de développer des dyskinésies sous traitement par la L-DOPA.

Traitement par la L-DOPA : Le traitement est administré par voie orale à la dose de 200 / 20 mg / kg (Sinemet[®], Dupont Pharma) (Murer et coll., 1998) en deux prises par jour, et débute 5 semaines après les greffes. La durée du traitement est de 4 semaines.

Préparation et transplantation de neurones issus du mésencéphale ventral :

Les greffes sont réalisées entre la 3^{ème} et la 4^{ème} semaine après la lésion à la 6-OHDA. Des femelles SPD gestantes (E15) sont sacrifiées et les embryons récupérés dans un milieu HBSS. Une fois les embryons prélevés, les mésencéphales ventraux sont extraits et conservés à 4°C dans un milieu d'hibernation (tampon phosphate isotonique contenant une forte concentration de potassium et de lactate permettant le maintien de l'intégrité neuronale).

Les pièces mésencéphaliques sont dilacérées à l'aide d'un scalpel, puis dissociées par traitement enzymatique dans du milieu HBSS (Hank's Balance Salt Solution) avec 0,1% de trypsine à 37°C pendant 15 min. La réaction est ensuite stoppée à l'aide de SVF (sérum de veau foetal) 10% dans l'HBSS, 5 min à température ambiante. Après décantation, le milieu est éliminé et les pièces neurales

sont rincées 3 fois avec 1 ml de HBSS/ DNase (100 µg/ml) puis, incubées 10 min à 37°C dans 5 ml de ce même milieu. Les cellules sont ensuite dissociées par trituration à la pipette de 5 ml puis 1 ml, et sont récupérées après passage sur un tamis cellulaire (cell strainer) de 70 µm puis centrifugées 10 min à 750 t/min. Le culot est ensuite repris dans 5 ml de HBSS/DNase et les cellules sont comptées à l'aide d'un hémacytomètre (cellule de Bürker). Après une nouvelle centrifugation de 10 min à 750 t/min, les cellules sont resuspendues à une concentration de 1.10^6 cellules/µl dans le milieu HBSS/ DNase. Toutes les greffes sont effectuées avec du tissu frais, disséqué et mis en suspension cellulaire juste avant l'injection cérébrale. Après chaque série d'injections stéréotaxiques, la viabilité des cellules de la suspension cellulaire est évaluée par un marquage à l'éosine.

Dans le but de rétablir un apport dopaminergique homogène dans le striatum, deux injections stéréotaxiques de 2,0µl de cellules embryonnaires sont réalisées dans deux sites de greffes dans le striatum et une injection de 2,0µl de ces mêmes cellules dans la substance noire. Les rats sont placés sur un cadre stéréotaxique. Les cellules sont injectées aux coordonnées suivantes (en mm, par rapport au Bregma toujours d'après l'atlas stéréotaxique de Paxinos et Watson, 1982) :

	Site 1	Site 2
antéro-postérieur	+ 1,7	- 0,2
Latéral (+ pour la droite)	± 2,4	± 3
ventral	- 5,2 et - 3,6	- 6 et - 4,2

Barre des dents -3.3mm par rapport au Bregma.

Dans la SNc, l'injection a lieu aux coordonnées suivantes : antéro-postérieur, - 5,3 ; latéral, ± 2,4 (+ pour la droite); ventral, -7,6 (en mm par rapport au Bregma) la barre des dents -3,3.

Les cellules sont injectées à la vitesse de $0,5\mu\text{l.min}^{-1}$ à la même vitesse et par le même procédé que la 6-OHDA, puis la canule est laissée en place 4 minutes après injection, avant d'être retirée lentement afin d'éviter tout phénomène d'aspiration.

Après chaque série d'opération le pourcentage de cellules mortes dans la suspension cellulaire variait entre 10% et 20%.

4.2.3 Analyse

4.2.3.1 Analyse comportementale

Les tests comportementaux sont réalisés une semaine avant les lésions de la voie dopaminergique nigro-striatale, puis toutes les semaines après, à raison d'une série de tests par semaine (comportant le stepping-test, le rotarod et le « VBall test », ce dernier a été mis au point au laboratoire).

Les facultés motrices des rats traités lors de cette étude sont observées par différents tests comportementaux basés sur des réactions innées et involontaires, ce qui rend les résultats reproductibles pour un animal donné.

« Stepping test »

Le « Stepping Test » est pratiqué afin de quantifier l'akinésie des membres antérieurs des rats traités lors de cette étude. Les rats sont saisis, pattes postérieures maintenues, tandis que les pattes antérieures touchent la surface de la paillasse, recouverte d'une surface non glissante. Le nombre de rétablissements de l'équilibre est compté pour chaque patte antérieure alors que l'animal est tiré manuellement en arrière à une vitesse constante (90cm en 5s ; figure 21). Le test est répété 3 fois, puis les pas sont additionnés. Chaque « stepping test » est filmé par une caméra numérique DCR-TRV110E (Sony Co., Tokyo, Japon).

Figure 21



“Rotarod”

Afin de mettre en évidence les problèmes moteurs des animaux, l'expérimentateur les fait courir sur un cylindre en rotation (rotarod ; Bioseb, Chaleville, France) à vitesse constante (6 t/min ; figure 22). Suite à cet exercice de marche forcée, en tombant sur une pédale, le rat stoppe un chronomètre. C'est ce temps qui, additionné 3 fois, est retenu comme score. Le score maximal à chaque essai est limité à 120 secondes (2 minutes). Le score total est donc compris entre 0 (coordination motrice nulle) et 360 (coordination motrice normale).

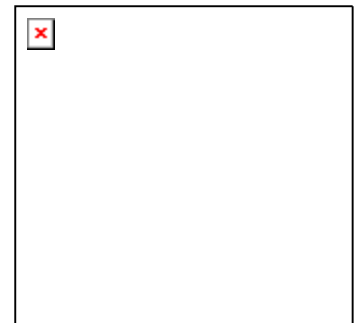
Figure 22



Test de la balle (V Ball test)

Le test de la balle, mis au point au laboratoire, permet l'appréciation de la capacité de l'animal à initier ses mouvements. Le rat est maintenu, les pattes en l'air pour qu'il s'agrippe à une balle de tennis accrochée à un fil. La balle tenue par le fil est lentement descendue jusqu'au plan de travail, jusqu'à ce que le dos de l'animal soit à son contact (figure 23), alors les rats se retournent spontanément sur leurs pattes s'ils n'ont pas de déficit de l'initiation du mouvement. Le temps que le rat lâche la balle pour se remettre sur ses pattes est chronométré 3 fois. Le score du rat correspond à la somme des temps des 3 essais. Le score maximal à chaque essai est limité à 120 secondes (2 minutes). Le score total est donc compris entre 0 (score d'un rat normal) et 360 (forte rigidité).

Figure 23



Analyse des dyskinésies

Les mouvements anormaux sont analysés entre 10h00 et 10h30 soit environ 2 h après la prise du matin de L-DOPA pour les animaux traités. Pour qu'un mouvement soit classé comme anormal, il faut qu'il soit répétitif, différent des comportements normaux et observés uniquement chez les rats traités.

Ces mouvements anormaux ont été classés en 4 sous-types (Cenci et coll., 1998).

- "mouvements rotatoires", correspondant à une rotation involontaire de l'animal sur lui-même.
- Dystonie axiale, correspondant à l'inclinaison tonique du cou d'un côté (la plupart du temps contralatéral au côté le plus lésé).
- Dyskinésie orolinguale, correspondant à un mouvement stéréotypé des mâchoires.
- Mouvements anormaux stéréotypés (dyskinésies) de la (ou des) patte(s) avant(s).

Pour chacun de ces quatre sous-types de mouvements anormaux, est attribué un score de 0 à 4 (0 = absent ; 1 = occasionnel; 2 = fréquent; 3 = continu mais interrompu par une distraction sensorielle ; 4 = continu, sévère et non interrompu par une distraction sensorielle).

Ainsi, le rat obtient un score total de 0 (pas de dyskinésies) à 16 (dyskinésies sévères).

4.2.3.2 Analyse anatomobiochimique

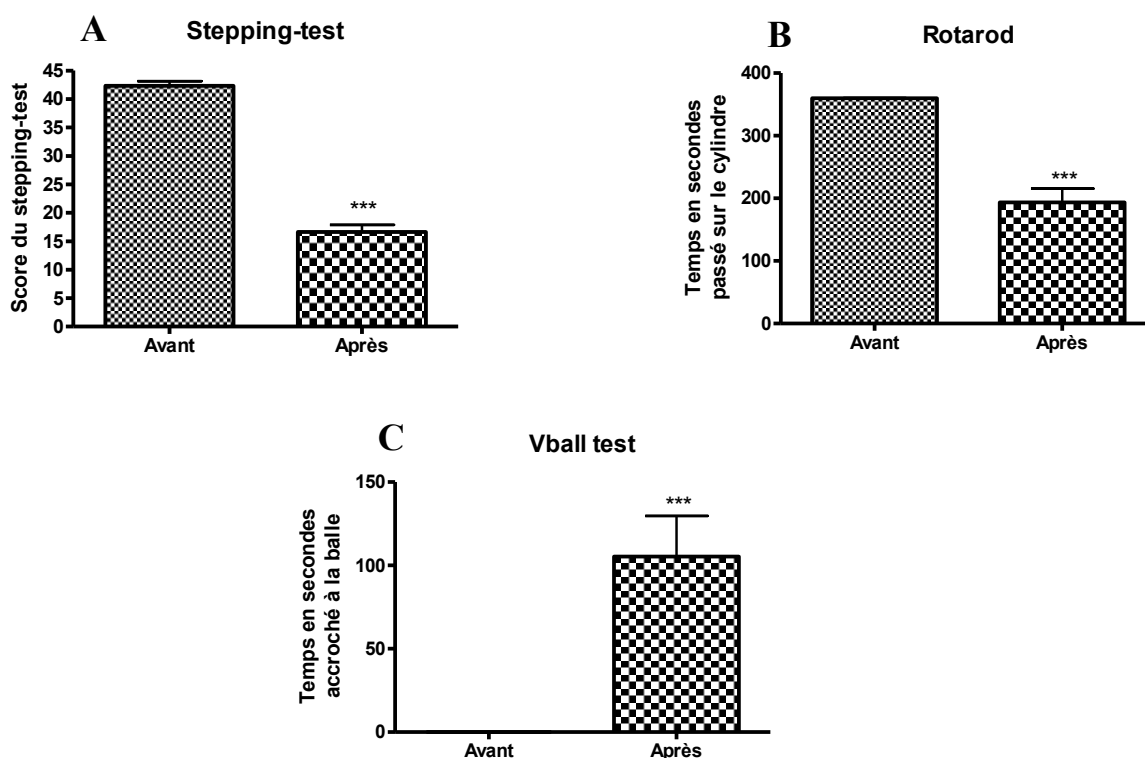
Par immunohistochimie : Elles sont effectuées sur des coupes frontales sériées de cerveaux, d'une épaisseur de 20 μm au niveau des greffons. Les animaux ont été préalablement perfusés en intracardiaque avec une solution de paraformaldéhyde à 4 %.

4.3 Résultats préliminaires

4.3.1 Aspects comportementaux

4.3.1.1 Comportements après la lésion

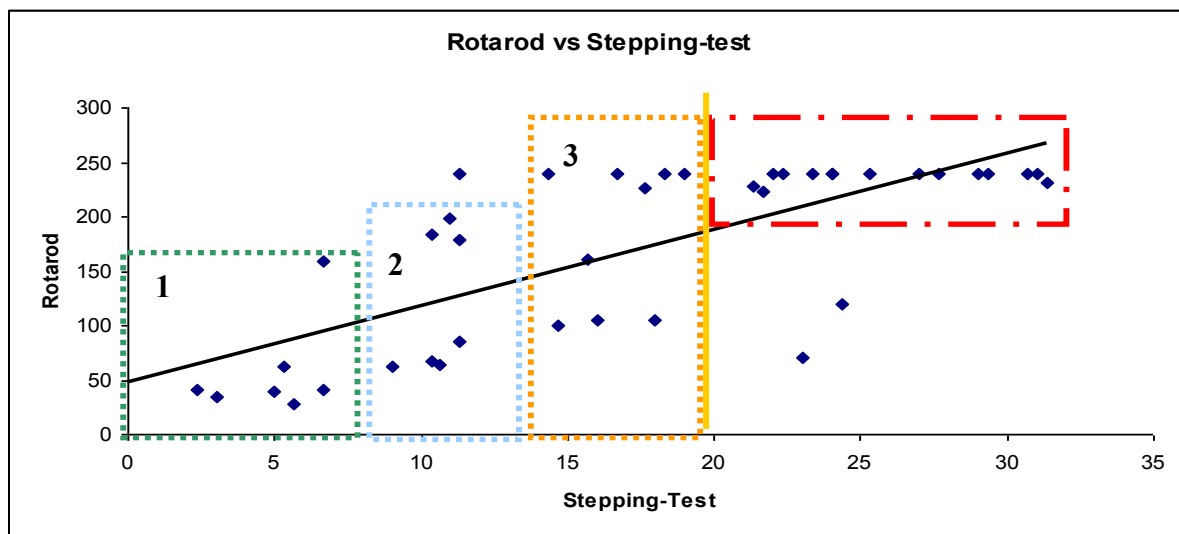
Au cours des deux premières semaines suivant la lésion, 10 rats (20%) sont morts. Dès les premières semaines, des déficits moteurs sévères sont mis en évidence par différents tests comportementaux avec altération significative des performances au stepping-test, au rotarod et au VBall test ($p < 0,001$; test non paramétrique apparié des rangs signés de Wilcoxon) (graphe 2).



Gratification 2 : Comportements avant et 2 semaines après la lésion bilatérale à la 6-OHDA. Ces graphes montrent les résultats comportementaux des rats 2 semaines après la lésion. Ceux des animaux lésés sont très significativement altérés sur les trois tests utilisés. Le stepping-test met en évidence l'akinésie des membres antérieurs (graphe 2A), le rotarod la coordination motrice (graphe 2B) et le VBall test la rigidité et la difficulté à initier le mouvement (graphe 2C). Ces tests sont analysés en utilisant le test apparié non paramétrique des rangs signés de Wilcoxon (***) : $p < 0,001$.

4.3.1.2 La présélection

Les rats ayant les plus fortes altérations au stepping-test (<20) et au rotarod sur les 50 opérés ont été sélectionnés (parmi les survivants). 25 rats en dessous de cette valeur ont été répartis en fonction de leurs scores moteurs en trois catégories (graphe 3). Les animaux de chaque catégorie ont été répartis, aléatoirement et de manière équilibrée, dans les différents groupes expérimentaux (Cf synopsis).



Grappe 3 : Présélection comportementale des rats ayant les scores moteurs les plus altérés (au stepping-test et au rotarod). Les rats sélectionnés ont été séparés en 3 catégories en fonction de leur altération motrice : 1= très fortement altéré (vert), 2=fortement altéré (bleu) et 3= moins fortement altéré (orange). Le cadre rouge correspond aux rats dont les scores moteurs sont très peu altérés, et qui n'ont pas continué l'étude.

4.3.1.3 Effets des greffes et de la L-DOPA

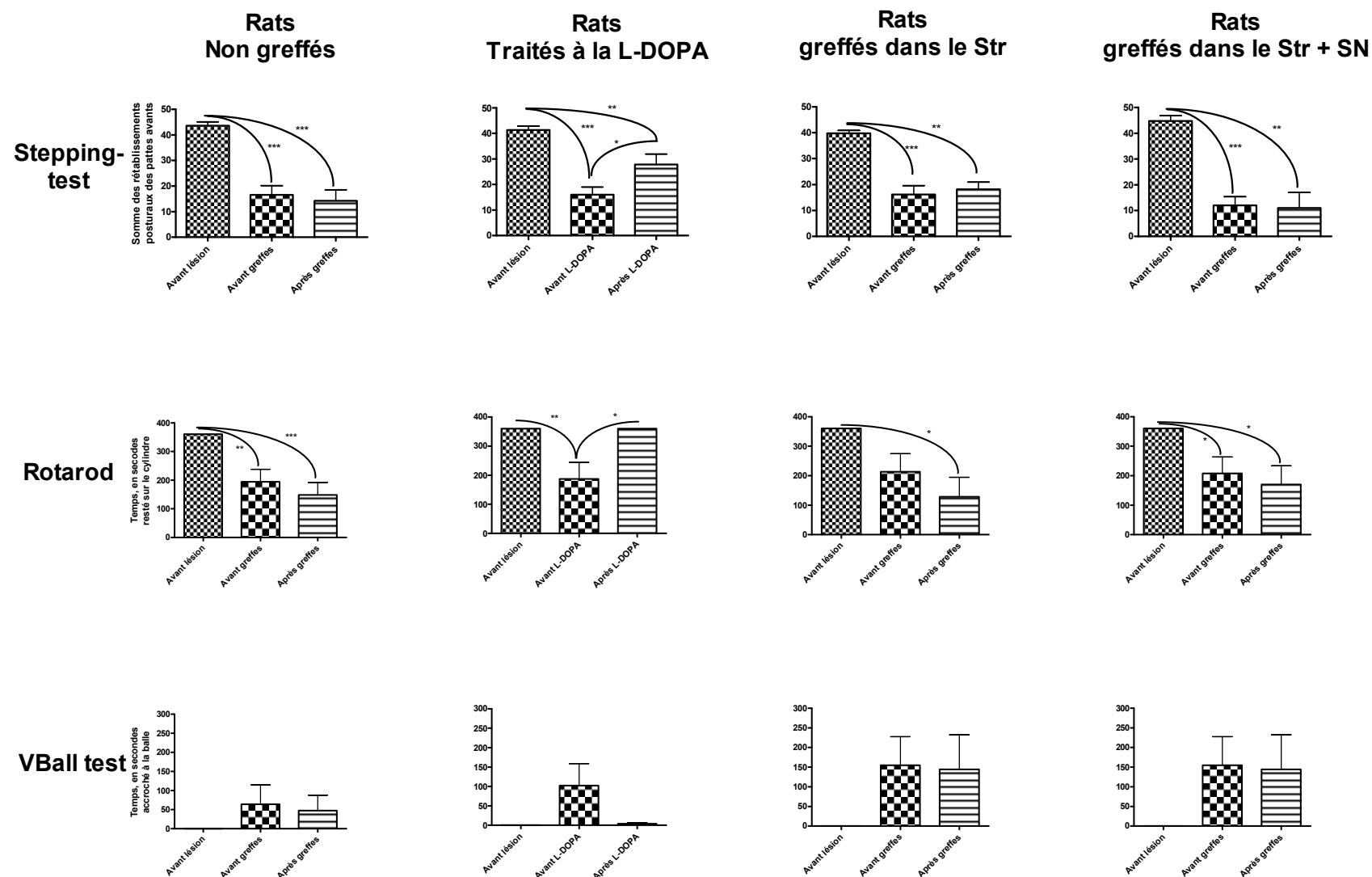
Les scores moteurs au rotarod et au stepping-test ont été améliorés de manière significative chez les rats lésés après traitement par la L-DOPA (graphe 4). Il n'y avait pas de différence significative au score du VBall test en raison d'une forte variabilité d'un rat à l'autre.

Cinq rats sur les 6 traités par la L-DOPA (83%) ont développé des dyskinésies (Tableau 6). Les dyskinésies apparaissent préférentiellement du côté le plus sévèrement altéré au stepping test.

		Mouvements rotatoires		Dyskinésies des pattes antérieures		Dystonie		Dyskinésies orofaciales	Score total
		Droite (CW+)	Gauche (CW-)	Droite	Gauche	Droite	Gauche		
	Rats								
Rats traités à la L-DOPA	318	2	0	2	0	1	0	3	8
	321	0	3	0	3	0	3	1	10
	324	4	0	1	0	4	2	2	13
	335	0	0	0	0	0	0	1	1
	336	0	4	0	4	0	4	3	15
	341	0	3	0	1	0	3	2	9

Tableau 6 : Scores des mouvements anormaux involontaires après 2 jours de traitement par la L-DOPA (200mg/kg/jour). En jaune sont les rats qui ont développé des mouvements anormaux clairement visibles. CW+ (sens des aiguilles d'une montre et CW- (sens inverse des aiguilles d'une montre).

Quelque soit le type de greffe effectué, les animaux n'ont pas eu de récupération motrice (avec les tests utilisés) par rapport aux scores moteurs avant la greffe et aux scores moteurs des rats lésés et non greffés (graphe 4).



Graph 4 : Ensemble des tests comportementaux réalisés au cours de l'expérience. Les premières barres (gris foncé) correspondent aux scores moteurs avant la lésion, les secondes (gris moyen) correspondent aux scores moteurs après la présélection CAD 4 semaines après la lésion. Enfin les dernières barres (gris clair) correspondent aux scores moteurs la semaine avant le sacrifice (9 semaines après la greffe ou 4 semaines après L-DOPA soit en tout 13 semaines après les lésions à la 6-OHDA). Les tests ont été réalisés en utilisant un test ANOVA apparié suivi d'un test post hoc de Newman-Keuls. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ et *** = $p < 0,001$.

4.3.2 Aspects histologiques

Les premiers résultats d'immunohistochimies réalisées au niveau des différentes greffes striatales et nigrales montrent que le greffon est présent encore 9 semaines après la greffe, avec une activité métabolique correcte mise en évidence par le marquage au cytochrome oxydase (Figure 24). De plus, ce greffon présente un marquage TH périphérique semblant indiquer la présence de neurones dopaminergiques (Figure 24).

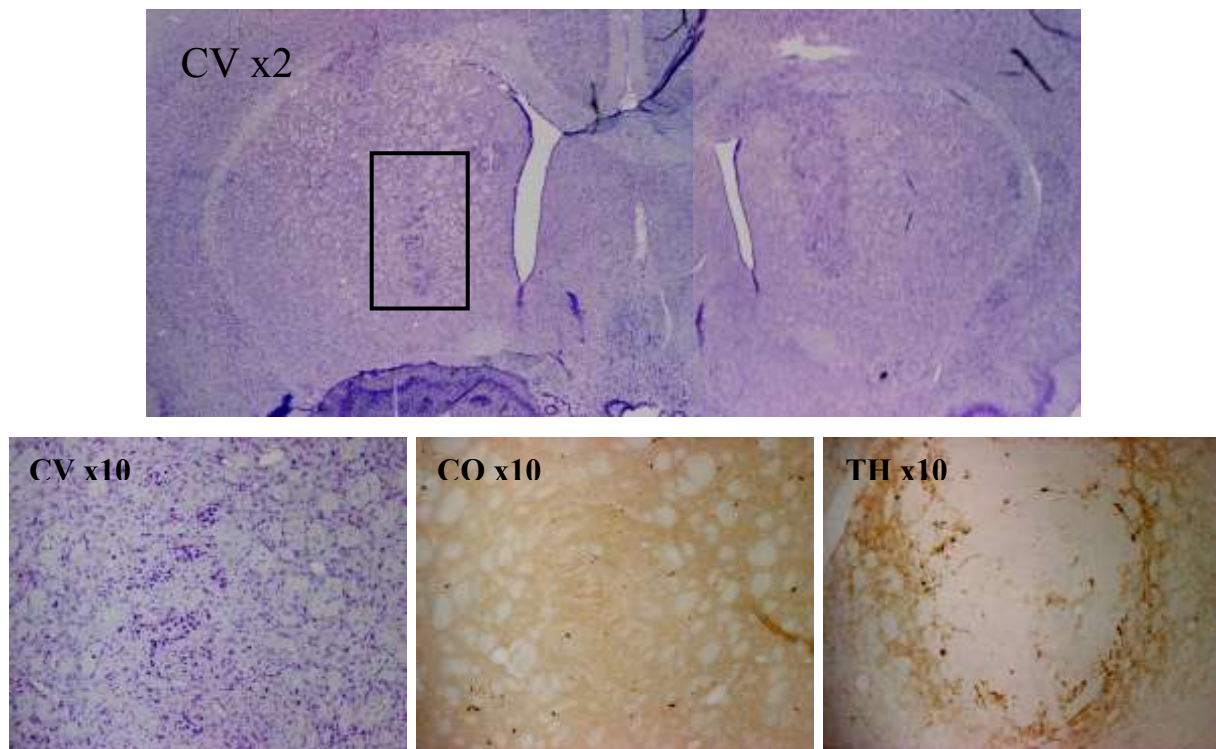


Figure 24 : Marquages au niveau striatal d'un rat lésé de manière bilatérale et greffé dans le striatum, réalisé avec l'anticorps anti Tyrosine hydroxylase (TH), et marquage au crésyl violet (CV) et à la cytochrome oxydase (CO)

D'autres marquages immunohistochimies complémentaires sont en cours de réalisation (OX18, OX42, R7/3, GFAP, NeuN, DAT) qui permettront de mieux caractériser ces différents greffons. Actuellement, il est difficile de conclure sachant que tous les rats n'ont pas été encore marqués. En revanche, une fois les

immunohistochimies réalisées, des analyses plus fines de corrélations pourront être effectuées afin de comprendre pourquoi ces greffes n'ont pas entraîné de récupération motrice sur ces rats fortement lésés.

4.3.3 Discussion

L'expérience décrivant le modèle (Article 2) a montré que le stepping-test était prédictif du niveau lésionnel de l'animal, et surtout prédictif de la survenue des dyskinésies sous traitement par la L-DOPA qui apparaissent chez plus de la moitié des rats lésés. Le but de l'expérience était d'étudier le rôle de dopamine nigrale et striatale sur la récupération motrice, et parallèlement de voir si de telles greffes permettaient une récupération avec ou sans dyskinésies. Il était important de sélectionner des rats avec un niveau lésionnel tel qu'ils développeraient tous des dyskinésies sous L-DOPA. Pour cela, en se référant au travail précédent, nous avons sélectionné les rats qui présentaient le score du stepping le plus altéré (la moitié) croisé avec les scores du rotarod les plus altérés (graphe 3).

Les greffes effectuées n'ont pas eu d'effet sur le comportement moteur (sur les tests utilisés) contrairement au traitement de référence. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats : 1) La quantité de cellules greffées est insuffisante pour avoir un effet. 2) Cette absence de réelle récupération est consécutive à l'intégration insuffisamment fonctionnelle des cellules greffées dans le striatum et dans la substance noire. L'intégralité des résultats nous permettra préciser les raisons de cette non récupération fonctionnelle.

DISCUSSION GENERALE

1 Les avantages du modèle de maladie de Parkinson bilatéral chez le rat, dans une approche thérapeutique expérimentale

1.1 La viabilité permise par un « encadrement » de la période critique post-lésionnelle

Le modèle bilatéral par injection de 6-OHDA dans le FMT était considéré depuis longtemps comme un modèle non viable (Ungerstedt, 1971). Les rats sont en effet dans un état de catalepsie, et dans les jours suivants l'injection, ont des difficultés à boire et à manger (aphagie et adipsie). Cet état conduit à la mort quelques jours après l'opération. Dans notre modèle bilatéral partiel, ce même syndrome sévère a été observé dans les jours suivant l'opération. Les rats les plus sévèrement affectés sont nourris avec du lait pour bébé 1^{ère} âge, des céréales et des croquettes mouillées ; au bout de 2 semaines, 10 à 20% des rats environ finissent par décéder, les autres réussissent progressivement à se nourrir par eux-mêmes et reprennent du poids.

1.2 La distribution des lésions proche de celle de la maladie humaine

La distribution des lésions dopaminergiques est plus proche de celle de la maladie humaine où les lésions, même si elles sont souvent asymétriques, sont toujours bilatérales. Il faut néanmoins mentionner la présence d'une variabilité de la sévérité lésionnelle d'un rat à l'autre, lorsque l'on injecte la 6-OHDA dans le FMT. Ceci a été retrouvée par plusieurs expérimentateurs (Amalric et coll., 1995 ; Barnéoud et coll., 1995, Spirduso et coll., 1985) après injection dans le striatum, le FMT ou la substance noire. Bien que la cible de l'injection soit toujours la même d'un

animal à l'autre, le comportement, la perte dopaminergique dans la SNpc et la distribution régionale de l'immunoréactivité TH dans le striatum varient. De plus, les études sur les modèles bilatéraux par injection de 6-OHDA dans le striatum ont montré qu'il existe, la plupart du temps, une différence d'immunoréactivité TH d'un côté à l'autre du striatum (Deumens et coll., 2002). Cet inconvénient potentiel est en fait contourné par la prédiction du degré de sévérité lésionnelle que permet l'analyse comportementale des animaux. Il est ainsi possible, en travaillant sur un grand nombre de rats, de séparer les groupes en fonction de leurs aptitudes motrices et de leur degré de sévérité lésionnel (quantifié à posteriori par l'immunoréactivité à la TH). La présence de niveaux de sévérités lésionnels variables permet des études corrélatives de puissance statistique intéressante.

1.3 L'absence de phénomène de compensation transhémisphérique

Il a été ainsi montré qu'une lésion unilatérale de la SNpc pouvait induire un bourgeonnement des fibres dopaminergiques dans la partie ventro-latérale du striatum (Blanchard et coll., 1996). De plus, à une compensation par bourgeonnement des neurones DA restants du côté lésé, peut s'ajouter une compensation comportementale due à un bourgeonnement des fibres dopaminergiques du côté non lésé. Ceci a été conforté par une étude récente montrant qu'une lésion bilatérale du striatum entraînait des déficits moteurs plus importants que ceux observés après une lésion unilatérale (Roedter et coll., 2001). Un résultat similaire est retrouvé avec notre modèle puisqu'en bilatéral la quantité de 6-OHDA à injecter dans le FMT a pu être réduite d'un facteur 4, pour un même niveau lésionnel (partiel) que dans un modèle unilatéral.

1.4 Une évaluation « clinique » sensible et spécifique

L'évaluation clinique des modèles de rat unilatéraux repose classiquement sur l'évaluation des mouvements rotatoires provoqués par l'administration d'agents pharmacologiques dopaminergiques (apomorphine, amphétamines, ...). Ces mouvements rotatoires sont assez éloignés de ce qui est observé chez l'humain où des anomalies motrices existent en l'absence de tout traitement pharmacologique. En outre, les modifications de comportements obtenues par une action thérapeutique ne sont pas systématiquement synonymes de restauration dopaminergique. Le test du rotomètre (chapitre 2.2.2.3.4 de l'introduction) est le test qui a été le plus utilisé pour évaluer la récupération motrice consécutive à une greffe striatale dans les modèles unilatéraux (Bjorklund et Stenevi ; 1979 ; Dunnet et coll., 1981, 1981a, 1983, 1988 ; Herman et coll., 1985a, 1993). La compensation est complète 2 à 3 mois après l'implantation. Cependant, cette compensation ne correspond pas à un comportement normal puisque certains rats greffés ont un comportement rotatoire controlatéral après une injection d'amphétamines (Dunnet et coll., 1981, 1983a ; Herman et coll., 1985a, 1993). Des études de microdialyse *in vivo* ont montré que le niveau de dopamine libéré après une injection d'amphétamines était moins élevé dans le striatum greffé que dans le striatum contralatéral (Herman et coll., 1993). De ce fait, les greffes peuvent perturber les rotations induites par l'apomorphine ou les amphétamines, en endommageant les récepteurs post-synaptiques situés sur le striatum. De tels dommages augmenteraient le déficit au test du stepping, alors qu'ils diminuent les rotations induites par les drogues, rendant ce phénomène impossible à distinguer de l'effet thérapeutique d'une substance administrée pour diminuer les symptômes de la maladie (Barker et Dunnett, 1994). Ainsi, il peut y avoir une mauvaise interprétation entre l'observation de comportements et les dommages

neuronaux en utilisant ces tests. De ce fait, le test du stepping (Chang et coll., 1999 ; Olsson et coll., 1995) semble préférable comme indicateur de la perte DA dans des expériences où il pourrait y avoir des dommages du striatum. Ainsi, au cours de greffes dopaminergiques striatales c'était en fait les lésions post synaptiques plus que la réinervation dopaminergique qui étaient à l'origine d'un aspect « faussement réparateur » de cette action thérapeutique.

Dans notre modèle, les troubles du comportement moteur appréciés par le stepping-test et le rotarod sont liés au degré de sévérité des lésions dopaminergiques et sont réversibles sous traitement dopaminergique.

1.5 Le développement de dyskinésies provoquées par la L-DOPA

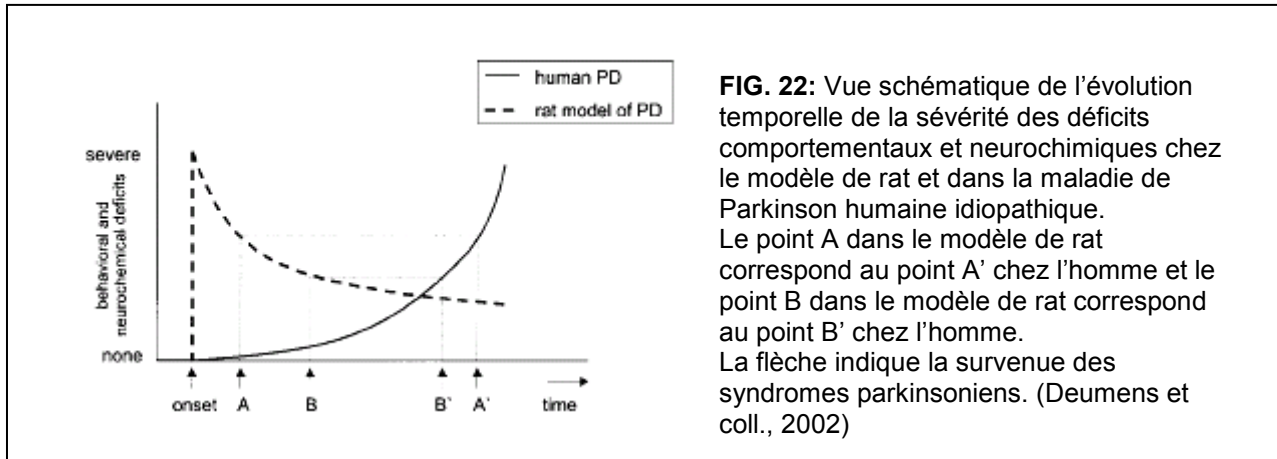
Des dyskinésies ont été obtenues sous traitement dopaminergique dans notre modèle avec une sémiologie qui se rapproche plus des anomalies motrices observées en clinique humaine (dystonie cervicale, mouvements répétitifs et brusques des membres, dyskinésies buccales) que ne le sont les comportements de rotation des modèles unilatéraux. La pertinence des dyskinésies provoquées par L-DOPA dans le modèle de rat 6-OHDA a été remis en question (Langston et coll., 2000 ; Nutt., 1990 ; Brotchie et Fox, 1999 ; Bezard et coll., 2001 ; Chase., 1998). Il a été suggéré que le mouvement rotatoire était le mouvement prépondérant et que les autres critères analysés ne seraient que des conséquences d'une compensation induite par ce mouvement rotatoire intense. Cependant, la présence de ces mouvements anormaux chez certains rats traités par la L-DOPA ne développant pas de mouvements rotatoires va à l'encontre de cette hypothèse (Winkler et coll., 2002). De plus, les rats traités à la bromocriptine (antiparkinsonien qui n'induit pas de dyskinésies *de novo*) développent uniquement un mouvement rotatoire en l'absence de mouvements anormaux (Lundblad et coll., 2002).

Il faut cependant souligner que dans notre modèle, les dyskinésies observées apparaissent dès le premier jour de traitement alors que chez l'Homme elles mettent plusieurs années à se manifester. La même observation est faite dans notre étude avec lésion unilatérale (Article 1). Les dyskinésies apparaissent en fait à partir d'un certain seuil de dénervation (Article 1 et 2). Chez l'homme, le seuil de lésion nécessaire au développement de dyskinésies n'est probablement atteint qu'après quelques années après l'apparition des symptômes ; chez quelques patients avec un syndrome parkinsonien sévère consécutif à une intoxication au MPTP, des dyskinésies ont été observées dès les premiers jours de traitement par L-DOPA (Ballard et coll., 1985). Cependant le niveau de perte dopaminergique n'est probablement pas le seul facteur impliqué dans le développement des dyskinésies. Les modalités d'administration du traitement dopaminergique jouent en effet aussi un rôle. Il est possible que l'administration de doses plus faibles et plus fractionnées de L-DOPA dans notre modèle, puissent entraîner une apparition retardée des dyskinésies. Comme chez l'Homme, les dyskinésies obtenues chez nos animaux étaient asymétriques, avec une prédominance controlatérale au côté le plus lésé.

1.6 Les limites de ce modèle

Quand on induit une lésion DA chez un rat, le rat va passer d'un état sain sans symptôme parkinsonien (avant la lésion) à un stade sévère de la maladie. A partir de ce moment là, des mécanismes compensatoires vont se mettre en jeu pour compenser ce déficit neurobiologique. Cela veut dire que les symptômes parkinsoniens du rat vont tendre à diminuer au cours du temps. A contrario, la maladie humaine idiopathique est progressive avec une évolution inverse de celle du modèle : les symptômes de la maladie vont s'aggraver avec le temps.

Cette contradiction entre la situation idiopathique et la situation du modèle animal est schématisée par la figure 22 (Deumens et coll., 2002)



1.7 Les intérêts de ce modèle en thérapeutique expérimentale

Le modèle bilatéral obtenu par injection de 6-OHDA dans le FMT est un modèle pertinent pour une approche thérapeutique expérimentale de la maladie de Parkinson et de ses complications motrices : les rats développent en effet, des anomalies comportementales quantifiables et réversibles sous L-DOPA et des mouvements anormaux involontaires sous ce traitement, qui se rapprochent des dyskinésies observées chez l'Homme. Des stratégies thérapeutiques médicamenteuses, chirurgicales (action au niveau du NST par exemple) ou de thérapies cellulaires (cf chapitre 3 de l'introduction) peuvent ainsi être évaluées pour prévenir ou corriger le déficit dopaminergique de façon optimale.

Ce modèle présente aussi un intérêt pour l'investigation physiopathologique. Ainsi, nous avons pu montrer l'existence d'un seuil lésionnel nécessaire à l'apparition de dyskinésies sous traitement par L-DOPA. A l'aide de ce modèle, les facteurs impliqués dans la genèse ou le maintien des dyskinésies pourraient être recherchés.

2 La cinétique des phénomènes inflammatoires et neurotrophiques associés à la destruction des neurones dopaminergique par la 6-OHDA

Le modèle de la maladie de Parkinson développé a été utilisé pour explorer les mécanismes de la dégénérescence des neurones dopaminergiques.

Bien que la cause de la maladie de Parkinson soit encore inconnue, le stress oxydatif pourrait être un élément causal dans un certain nombre de cas. La destruction des neurones dopaminergiques par injection de 6-OHDA a été prise comme modèle de la mort neuronale qui survient dans la maladie de Parkinson, pour étudier les cinétiques d'expression des gènes de l'inflammation et des facteurs neurotrophiques, associées à la perte des neurones dopaminergiques.

2.1 PCR quantitative

La PCR quantitative en temps réel, TaqMan[®], permet la détection directe des produits de PCR par la mesure de l'augmentation progressive de la fluorescence émise par l'attache du fluorochrome, le SYBER Green, au cours de la synthèse des doubles brins d'ADN. Pour minimiser les variations expérimentales d'un échantillon à l'autre (par exemple, les différences de rendements d'extraction, d'intégrité de l'ARN et d'efficacité de la RT), le nombre de copies de chaque transcrit est normalisé par rapport au nombre de copies de transcrits d'un gène de ménage, l'hypoxanthine phosphoribosyl transférase (HPRT). Cette technique est très sensible pour mesurer l'expression des gènes étudiés (Louvét et coll., 2004). L'absence de détection de l'ARNm du BDNF dans le striatum conforte la spécificité de cette technique et la qualité du prélèvement de l'échantillon, l'ARNm de BDNF étant absent du striatum et la protéine présente dans les fibres et non dans les corps cellulaires (Murer et coll., 2001). Pour le striatum, le prélèvement ne concerne que ce noyau. En revanche, au

niveau du mésencéphale ventral, la structure analysée est plus hétérogène : elle comporte la SNpc mais aussi la substantia nigra pars reticulata, des fibres du pédoncule cérébral et une partie du noyau rouge. Les cellules microgliales activées après dénervation dopaminergique sont néanmoins à ce niveau essentiellement localisées dans la SNpc ; les facteurs trophiques GDNF et BDNF sont eux aussi connus pour être préférentiellement exprimés dans la SNpc. L'analyse des ARNm donne des indications sur les événements cellulaires précoces déclenchés par l'action de la 6-OHDA, mais ne dénote pas forcément du « message » protéique effectif qui en découle, de nombreux processus de régulation intervenant au niveau des ARNm, de la traduction et des modifications post-transcriptionnelles (Depino et coll., 2003).

2.2 Analyse moléculaire

La mort neuronale induite par la 6-OHDA dans les modèles de rat de la maladie de Parkinson n'est probablement pas identique à celle de la maladie humaine. Dans cette dernière, la perte est beaucoup plus progressive et semble impliquer une aggrégation de protéines anormales dont les corps de Lewy sont probablement le reflet (présence d' α -synucléine et d'ubiquitine, cf chapitre 1.2.1 de l'introduction).

La 6-OHDA induit deux des phénomènes majeurs de la pathologie humaine, à savoir un fort stress oxydant et une inhibition mitochondriale. L'utilisation de cette toxine pour générer des modèles animaux de la maladie semble d'autant plus pertinente que la 6-OHDA pourrait être présente de manière endogène dans les cellules dopaminergiques. En effet, les neurones dopaminergiques contiennent des quantités non négligeables de fer (chapitre 1.5.4 de l'introduction) et produisent du peroxyde d'hydrogène grâce à la désamination normale de la dopamine (figure 10).

Or des études tendent à montrer que la dopamine, en présence de Fe^{2+} et de peroxyde d'hydrogène, peut-être convertie en 6-OHDA de manière non enzymatique (cf chapitre 1.5.4 stress oxydant) (pour revue Zecca et coll., 2004).

Contrairement au modèle de rat, la 6-OHDA n'est pas présente de manière massive dans le cerveau des patients parkinsoniens, mais ce modèle permet de voir comment la substance noire et le striatum réagissent à une agression par un stress oxydatif important et à une dénervation dopaminergique. L'étiologie de la maladie n'étant pas encore bien connue, ce modèle est pertinent pour étudier la pathogénie de la maladie de Parkinson.

Dans ce modèle, l'analyse moléculaire montre que l'effet spécifique de la 6-OHDA n'apparaît sur les marqueurs étudiés qu'au delà de la 3^{ème} semaine après l'injection. Le premier évènement observé est une augmentation transitoire de iNOS dans le MV puis une augmentation du CD11b à 4 semaines (témoin d'une activation des cellules microgliales). Un tel processus a été fortement suggéré par l'observation chez les patients intoxiqués par le MPTP de la persistance d'infiltrats microgliaux dans la SNpc 3 à 16 ans après l'intoxication (Langston et coll., 1999).

Parallèlement à l'augmentation d'expression de CD11b, a été observée une forte augmentation de l'expression de GDNF dans le VM. Le GDNF étant connu pour être libéré par la microglie activée (Batchelor et coll., 1999), le caractère contemporain de ces 2 phénomènes n'est donc pas très surprenant.

2.3 Conclusion

La cinétique d'expression des marqueurs d'activation microgliale et des facteurs neurotrophiques après injection bilatérale de 6-OHDA dans le FMT reste à interpréter avec précaution car elle ne dénote pas de l'effet protéique final produit. Néanmoins, l'activation microgliale précoce (troisième semaine après l'injection)

semble être surtout la conséquence non spécifique du traumatisme physique de l'injection et n'entraîne pas de perte conséquente en neurones dopaminergiques. En effet, l'altération motrice importante des rats injectés avec la 6-OHDA (les jours suivant l'injection) n'est pas corrélée avec une expression différentielle de l'expression des gènes témoignant d'une activité microgliale. La réaction microgliale semble ne survenir que dans un deuxième temps et, sur les marqueurs analysés dans cette étude, être plutôt impliquée dans une tentative infructueuse de protection des neurones en voie de dégénérescence.

Cette meilleure connaissance des gènes associés à la dégénérescence des neurones dopaminergiques pourrait permettre d'envisager une approche thérapeutique expérimentale pour stopper ou ralentir le processus dégénératif.

En outre la connaissance de la cinétique des marqueurs de l'inflammation et des facteurs neurotrophiques est un pré requis incontournable à l'analyse des phénomènes immunologiques associés à une thérapie cellulaire expérimentale.

3 Efficacité des greffes

L'objectif de notre étude était double : tout d'abord optimiser le rétablissement dopaminergique en greffant des neurones dopaminergiques à la fois dans le striatum et dans la substance noire ; le deuxième objectif était de voir si des rats pouvant développer des dyskinésies sous L-DOPA (présélection comportementale) développaient des dyskinésies après une greffe. L'analyse des premiers résultats montre que les rats greffés n'ont pas d'amélioration motrice par rapport aux rats non greffés sur les tests étudiés ; les premières analyses histologiques ont montré que les greffons étaient situés aux bons endroits et exprimaient la TH. En revanche, leur faible coloration au cytochrome oxydase montre que l'activité métabolique du greffon

n'est pas optimale. De plus, aucun de ces rats n'a développé de dyskinésies sous greffes alors que les rats traités par la L-DOPA en ont pratiquement tous développées (5/6). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées : 1) La lésion est peut-être trop importante (pas encore quantifiée) pour que les greffons aient un effet fonctionnel ; 2) les greffes n'ont peut-être pas d'effet sur des tests plus élaborés que les simples rotations sous drogue (Herman et Abrous, 1994). En ce qui concerne les dyskinésies sous greffe, une étude récente sur un modèle unilatéral de rat a montré que des greffes striatales augmentaient la sévérité des dyskinésies sur des rats préalablement traités par la L-DOPA (Steece-Collier et coll., 2003).

Ces expériences récentes effectuées chez le rat soulignent les difficultés d'une thérapie cellulaire au niveau cérébral. Il reste en effet assez illusoire de penser que le simple apport de cellules neuronales au sein d'un tissu adulte puisse réinnervier ce dernier d'une façon totalement satisfaisante. De plus, dans ces modèles expérimentaux, l'utilisation de souches animales identiques pour le donneur et le receveur, limite les effets du rejet immunitaire qui semble jouer un rôle dans la survie des greffons allogènes comme l'attestent les 2 études américaines récentes (Winkler et coll., 2005).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

1 Apport de ce travail

Ce travail de thèse a permis le développement d'un modèle de rat de la maladie de Parkinson pertinent pour l'évaluation de stratégies thérapeutiques visant à compenser le déficit dopaminergique. Les animaux présentent des altérations motrices bilatérales spécifiques et quantifiables par le stepping-test et le rotarod, réversibles sous traitement par L-DOPA. De plus, l'utilisation de ces tests permet d'avoir un « indice moteur » prédictif du niveau lésionnel de l'animal et donc aussi prédictif de la survenue de dyskinésies sous traitement par la L-DOPA (article 1 et 2). Cette analyse comportementale offre ainsi la possibilité de faire une présélection des animaux, en fonction de l'expérience à réaliser, en terme de sévérité lésionnelle ou de réponse potentielle à la L-DOPA, pour obtenir un groupe homogène (par exemple un groupe susceptible de développer des dyskinésies sous L-DOPA). L'analyse histologique a montré la présence de lésion dopaminergique bilatérale avec une topographie lésionnelle proche de celle observée chez l'Homme.

Ce travail a permis de mettre en évidence que les dyskinésies provoquées par le traitement par la L-DOPA n'apparaissaient qu'à partir d'une valeur seuil de dénervation dopaminergique. A partir de cette valeur seuil, la sévérité de ces dyskinésies étaient proportionnelles au niveau lésionnel. Un tel résultat était depuis longtemps présent dans la maladie de Parkinson, mais n'avait jamais été clairement démontré.

La caractérisation du contexte immunologique (microgliale) et neurotrophique de ce modèle a montré que le seul traumatisme physique de l'injection stéréotaxique entraînait une variation importante de l'expression des gènes étudiés. Ces variations

étaient identiques chez les rats shams et les rats 6-OHDA les 3 premières semaines suivant l'opération.

L'effet spécifique de la 6-OHDA sur l'expression des gènes étudiés n'apparaissait qu'à partir de 3 semaines après l'opération, bien après la survenue des symptômes moteurs de la maladie. La microglie agirait plutôt de manière tardive 3 à 4 semaines après l'injection de 6-OHDA probablement de façon secondaire à la mort neuronale importante provoquée par l'action directe du neurotoxique. La présence concomitante d'ARNm du GDNF et de CD11b uniquement chez les rats lésés à la 6-OHDA suggère même un rôle potentiellement protecteur de la réaction microgliale. Une autre série de rats bilatéraux sacrifiés aux mêmes temps est en cours d'analyse par immunohistochimie. Le but étant de préciser le moment de la perte neuronale (précède t-il effectivement la réaction microgliale spécifique ?) et d'analyser le parallèle entre l'expression protéique des marqueurs étudiés et leur expression en ARNm.

Les résultats préliminaires de l'expérimentation de l'optimisation du rétablissement dopaminergique suggèrent que les greffes effectuées n'ont pas d'efficacité sur la récupération motrice alors que parallèlement le traitement par la L-DOPA a permis une récupération motrice quasi-normale, et a provoqué des dyskinésies chez 80% des animaux traités. La présence de greffons avec des neurones TH positifs laisse penser que l'intégration du greffon a lieu au niveau du striatum mais que cette dernière reste encore insuffisamment efficace pour permettre une récupération motrice effective.

2 Perspectives

Ce travail de thèse va se poursuivre par l'investigation de la physiopathologie des dyskinésies provoquées par la L-DOPA avec une approche en électrophysiologie expérimentale des dyskinésies, dans le laboratoire du Professeur Calabresi (Rome) au sein de l'Institut Européen de Recherche sur le Cerveau.

L'objectif scientifique de ce stage post-doctoral sera de mieux caractériser le rôle de la dopamine exogène dans la plasticité synaptique à court terme et à long terme en particulier celle impliquée dans la genèse des dyskinésies, en utilisant des techniques d'enregistrements électrophysiologiques des neurones moyens épineux (NMEs) du striatum dorsal sur le modèle de la maladie de Parkinson que nous venons de développer chez le rat.

La première partie de ce travail consistera à faire la corrélation entre la perte de neurones dopaminergiques (analysée par immunohistochimie), la plasticité synaptique (LTD et LTP) et le développement ou non de dyskinésies. Il permettra de déterminer le seuil de dénervation d'une plasticité défavorable à l'origine des dyskinésies.

La deuxième partie permettra d'étudier les effets de la modulation pharmacologique de la voie du NO (monoxyde d'azote) et des endocanabinoïdes sur la plasticité synaptique, dans ce même modèle. En effet le LTD, en plus de l'activation des récepteurs DA, nécessite la production de monoxyde d'azote (NO) (Calabresi et coll., 1999) et le relargage d'endocanabinoïdes (Gubellini et coll., 2002) au niveau du striatum. Ainsi, nous allons étudier l'interaction entre ces deux voies biochimiques et le système dopaminergique. L'effet de la variation des propriétés électriques produite par la modulation pharmacologique de NO et des

endocanabinoïdes sera étudié également sur ce même modèle de rat 6-OHDA développant ou non des dyskinésies sous L-DOPA.

Ces travaux devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes des dyskinésies observées chez les patients parkinsoniens traités par la L-DOPA, pouvant aider à améliorer les stratégies thérapeutiques, en corrigeant les anomalies cellulaires à l'origine des dyskinésies.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abeliovich, A., Y. Schmitz, et al. (2000). "Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system." Neuron **25**(1): 239-52.
- Agid, Y. (1991). "Parkinson's disease: pathophysiology." Lancet **337**(8753): 1321-4.
- Agid, Y., A. M. Graybiel, et al. (1990). "The efficacy of levodopa treatment declines in the course of Parkinson's disease: do nondopaminergic lesions play a role?" Adv Neurol **53**: 83-100.
- Agid, Y., M. Ruberg, et al. (1993). "Are dopaminergic neurons selectively vulnerable to Parkinson's disease?" Adv Neurol **60**: 148-64.
- Albin, R. L., A. B. Young, et al. (1989). "The functional anatomy of basal ganglia disorders." Trends Neurosci **12**(10): 366-75.
- Alexander, G. E. and M. D. Crutcher (1990). "Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing." Trends Neurosci **13**(7): 266-71.
- Alexander, G. E., M. R. DeLong, et al. (1986). "Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex." Annu Rev Neurosci **9**: 357-81.
- Alexi, T., C. V. Borlongan, et al. (2000). "Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases." Prog Neurobiol **60**(5): 409-70.
- Amalric, M., H. Moukhles, et al. (1995). "Complex deficits on reaction time performance following bilateral intrastriatal 6-OHDA infusion in the rat." Eur J Neurosci **7**(5): 972-80.
- Andersson, M., A. Hilbertson, et al. (1999). "Striatal fosB expression is causally linked with L-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in a rat model of Parkinson's disease." Neurobiol Dis **6**(6): 461-74.
- Anglade, P., S. Vyas, et al. (1997). "Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease." Histol Histopathol **12**(1): 25-31.

- Ankarcrona, M., J. M. Dypbukt, et al. (1995). "Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function." Neuron **15**(4): 961-73.
- Ara, J., S. Przedborski, et al. (1998). "Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7659-63.
- Arendt, T., V. Bigl, et al. (1983). "Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's Disease." Acta Neuropathol (Berl) **61**(2): 101-8.

B

- Baker, K. A., D. Sadi, et al. (2000). "Simultaneous intrastriatal and intranigral dopaminergic grafts in the parkinsonian rat model: role of the intranigral graft." J Comp Neurol **426**(1): 106-16.
- Ballard, P. A., J. W. Tetrad, et al. (1985). "Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases." Neurology **35**(7): 949-56.
- Banati, R. B., S. E. Daniel, et al. (1998). "Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease." Mov Disord **13**(2): 221-7.
- Barker, R. and S. B. Dunnett (1994). "Ibotenic acid lesions of the striatum reduce drug-induced rotation in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat." Exp Brain Res **101**(3): 365-74.
- Barneoud, P., M. Mazadier, et al. (1996). "Neuroprotective effects of riluzole on a model of Parkinson's disease in the rat." Neuroscience **74**(4): 971-83.
- Barneoud, P., S. Parmentier, et al. (1995). "Effects of complete and partial lesions of the dopaminergic mesotelencephalic system on skilled forelimb use in the rat." Neuroscience **67**(4): 837-48.
- Batchelor, P. E., G. T. Liberatore, et al. (2000). "Inhibition of brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor expression reduces dopaminergic sprouting in the injured striatum." Eur J Neurosci **12**(10): 3462-8.

- Batchelor, P. E., G. T. Liberatore, et al. (1999). "Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor." J Neurosci **19**(5): 1708-16.
- Beal, M. F. (1998). "Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis." Ann Neurol **44**(3 Suppl 1): S110-4.
- Beal, M. F. (2001). "Experimental models of Parkinson's disease." Nat Rev Neurosci **2**(5): 325-34.
- Beck, K. D., J. Valverde, et al. (1995). "Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain." Nature **373**(6512): 339-41.
- Bejjani, B. P., P. Damier, et al. (1999). "Transient acute depression induced by high-frequency deep-brain stimulation." N Engl J Med **340**(19): 1476-80.
- Bellissimo, M. I., I. Kouzmine, et al. (2004). "Is the unilateral lesion of the left substantia nigra pars compacta sufficient to induce working memory impairment in rats?" Neurobiol Learn Mem **82**(2): 150-8.
- Benabid, A. L., P. Pollak, et al. (1987). "Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease." Appl Neurophysiol **50**(1-6): 344-6.
- Benazzouz, A., T. Boraud, et al. (1995). "Riluzole prevents MPTP-induced parkinsonism in the rhesus monkey: a pilot study." Eur J Pharmacol **284**(3): 299-307.
- Benazzouz, A., B. Piallat, et al. (2000). "Implication of the subthalamic nucleus in the pathophysiology and pathogenesis of Parkinson's disease." Cell Transplant **9**(2): 215-21.
- Ben-Shachar, D., G. Eshel, et al. (1991). "The iron chelator desferrioxamine (Desferal) retards 6-hydroxydopamine-induced degeneration of nigrostriatal dopamine neurons." J Neurochem **56**(4): 1441-4.
- Ben-Shachar, D. and M. B. Youdim (1990). "Selectivity of melanized nigrostriatal dopamine neurons to degeneration in Parkinson's disease may depend on iron-melanin interaction." J Neural Transm Suppl **29**: 251-8.
- Bergman, H., A. Raz, et al. (1998). "Physiology of MPTP tremor." Mov Disord **13 Suppl 3**: 29-34.

- Bergman, H., T. Wichmann, et al. (1990). "Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus." Science **249**(4975): 1436-8.
- Bernheimer, H., W. Birkmayer, et al. (1973). "Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations." J Neurol Sci **20**(4): 415-55.
- Betarbet, R., T. B. Sherer, et al. (2000). "Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease." Nat Neurosci **3**(12): 1301-6.
- Bezard, E., J. M. Brotchie, et al. (2001). "Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies." Nat Rev Neurosci **2**(8): 577-88.
- Bilang-Bleuel, A., F. Revah, et al. (1997). "Intrastriatal injection of an adenoviral vector expressing glial-cell-line-derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of Parkinson disease." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): 8818-23.
- Bjorklund, A. (1992). "Dopaminergic transplants in experimental parkinsonism: cellular mechanisms of graft-induced functional recovery." Curr Opin Neurobiol **2**(5): 683-9.
- Bjorklund, A., D. Kirik, et al. (2000). "Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model." Brain Res **886**(1-2): 82-98.
- Bjorklund, A., C. Rosenblad, et al. (1997). "Studies on neuroprotective and regenerative effects of GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease." Neurobiol Dis **4**(3-4): 186-200.
- Bjorklund, A. and U. Stenevi (1979). "Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants." Brain Res **177**(3): 555-60.
- Blanchard, V., P. Anglade, et al. (1996). "Dopaminergic sprouting in the rat striatum after partial lesion of the substantia nigra." Brain Res **709**(2): 319-25.
- Blandini, F. and J. T. Greenamyre (1998). "Prospects of glutamate antagonists in the therapy of Parkinson's disease." Fundam Clin Pharmacol **12**(1): 4-12.

- Bloem, B. R., I. Irwin, et al. (1990). "The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease." J Neurol Sci **97**(2-3): 273-93.
- Blond, S., D. Caparros-Lefebvre, et al. (1992). "Control of tremor and involuntary movement disorders by chronic stereotactic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus." J Neurosurg **77**(1): 62-8.
- Blum, D., S. Torch, et al. (2001). "Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease." Prog Neurobiol **65**(2): 135-72.
- Bondy, S. C. and D. K. Lee (1993). "Oxidative stress induced by glutamate receptor agonists." Brain Res **610**(2): 229-33.
- Boyce, S., N. M. Rupniak, et al. (1990). "Nigrostriatal damage is required for induction of dyskinesias by L-DOPA in squirrel monkeys." Clin Neuropharmacol **13**(5): 448-58.
- Braga, R., I. Kouzmine, et al. (2005). "Lesion of the substantia nigra, pars compacta impairs delayed alternation in a Y-maze in rats." Exp Neurol **192**(1): 134-41.
- Breidert, T., J. Callebert, et al. (2002). "Protective action of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone in a mouse model of Parkinson's disease." J Neurochem **82**(3): 615-24.
- Brice, J. and L. McLellan (1980). "Suppression of intention tremor by contingent deep-brain stimulation." Lancet **1**(8180): 1221-2.
- Brooks, D. J. (2003). "PET studies on the function of dopamine in health and Parkinson's disease." Ann N Y Acad Sci **991**: 22-35.
- Brotchie, J. M. and S. H. Fox (1999). "Quantitative assessment of dyskinesias in subhuman primates." Mov Disord **14 Suppl 1**: 40-7.
- Brotchie, J. M., B. Henry, et al. (1998). "Opioid peptide precursor expression in animal models of dystonia secondary to dopamine-replacement therapy in Parkinson's disease." Adv Neurol **78**: 41-52.
- Brundin, P., O. G. Nilsson, et al. (1986). "Behavioural effects of human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease." Exp Brain Res **65**(1): 235-40.

- Burke, R. E., M. Antonelli, et al. (1998). "Glial cell line-derived neurotrophic growth factor inhibits apoptotic death of postnatal substantia nigra dopamine neurons in primary culture." J Neurochem **71**(2): 517-25.
- Burke, R. E. and N. G. Kholodilov (1998). "Programmed cell death: does it play a role in Parkinson's disease?" Ann Neurol **44**(3 Suppl 1): S126-33.
- Burns, R. S., C. C. Chiueh, et al. (1983). "A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(14): 4546-50.

C

- Calabresi, P., P. Gubellini, et al. (1999). "A critical role of the nitric oxide/cGMP pathway in corticostriatal long-term depression." J Neurosci **19**(7): 2489-99.
- Carman, L. S., F. H. Gage, et al. (1991). "Partial lesion of the substantia nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior." Brain Res **553**(2): 275-83.
- Cenci, M. A., P. Kalen, et al. (1992). "Dopaminergic transplants normalize amphetamine- and apomorphine-induced Fos expression in the 6-hydroxydopamine-lesioned striatum." Neuroscience **46**(4): 943-57.
- Cenci, M. A., C. S. Lee, et al. (1998). "L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA." Eur J Neurosci **10**(8): 2694-706.
- Chan, P., D. A. Di Monte, et al. (1997). "(+)MK-801 does not prevent MPTP-induced loss of nigral neurons in mice." J Pharmacol Exp Ther **280**(1): 439-46.
- Chang, J. W., S. R. Wachtel, et al. (1999). "Biochemical and anatomical characterization of forepaw adjusting steps in rat models of Parkinson's disease: studies on medial forebrain bundle and striatal lesions." Neuroscience **88**(2): 617-28.
- Chase, T. N. (1998). "Levodopa therapy: consequences of the nonphysiologic replacement of dopamine." Neurology **50**(5 Suppl 5): S17-25.
- Cheramy, A., V. Leviel, et al. (1981). "Dendritic release of dopamine in the substantia nigra." Nature **289**(5798): 537-42.

- Chesselet, M. F. and J. M. Delfs (1996). "Basal ganglia and movement disorders: an update." Trends Neurosci **19**(10): 417-22.
- Chevalier, G. and J. M. Deniau (1990). "Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions." Trends Neurosci **13**(7): 277-80.
- Chiba, K., A. Trevor, et al. (1984). "Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase." Biochem Biophys Res Commun **120**(2): 574-8.
- Combs, C. K., D. E. Johnson, et al. (2000). "Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPARgamma agonists." J Neurosci **20**(2): 558-67.
- Cotzias, G. C., P. S. Papavasiliou, et al. (1969). "L-dopa in parkinson's syndrome." N Engl J Med **281**(5): 272.

D

- Da Cunha, C., M. S. Gevaerd, et al. (2001). "Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia." Behav Brain Res **124**(1): 9-18.
- Da Cunha, C., S. Wietzikoski, et al. (2003). "Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system." Neurobiol Learn Mem **79**(3): 236-42.
- D'Amato, R. J., Z. P. Lipman, et al. (1986). "Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP+ binds to neuromelanin." Science **231**(4741): 987-9.
- Damier, P. (2002). "[Parkinson's disease]." Rev Prat **52**(11): 1255-60.
- Damier, P., E. C. Hirsch, et al. (1999a). "The substantia nigra of the human brain. I. Nigrosomes and the nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D(28K) immunohistochemistry." Brain **122**(Pt 8): 1421-36.
- Damier, P., E. C. Hirsch, et al. (1999b). "The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease." Brain **122**(Pt 8): 1437-48.
- Damier, P., E. C. Hirsch, et al. (1993). "Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease." Neuroscience **52**(1): 1-6.

- Damier, P., L. Tremblay, et al. (2000). "[Development of dyskinesias induced by treatment for Parkinson's disease: potential role of first exposure to L-DOPA (or phenomenon of priming)]." Rev Neurol (Paris) **156**(3): 224-35.
- Dauer, W., N. Kholodilov, et al. (2002). "Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14524-9.
- Davis, G. C., A. C. Williams, et al. (1979). "Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues." Psychiatry Res **1**(3): 249-54.
- Day, H. E., A. Badiani, et al. (2001). "Environmental novelty differentially affects c-fos mRNA expression induced by amphetamine or cocaine in subregions of the bed nucleus of the stria terminalis and amygdala." J Neurosci **21**(2): 732-40.
- de Silva, H. R., N. L. Khan, et al. (2000). "The genetics of Parkinson's disease." Curr Opin Genet Dev **10**(3): 292-8.
- Dehmer, T., J. Lindenau, et al. (2000). "Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity in vivo." J Neurochem **74**(5): 2213-6.
- DeLong, M. R. (1990). "Primate models of movement disorders of basal ganglia origin." Trends Neurosci **13**(7): 281-5.
- Denis-Donini, S., J. Glowinski, et al. (1984). "Glial heterogeneity may define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurones." Nature **307**(5952): 641-3.
- Depino, A. M., C. Earl, et al. (2003). "Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease." Eur J Neurosci **18**(10): 2731-42.
- Deumens, R., A. Blokland, et al. (2002). "Modeling Parkinson's Disease in Rats: An Evaluation of 6-OHDA Lesions of the Nigrostriatal Pathway." Exp Neurol **175**(2): 303-17.
- Dexter, D. T., D. J. Brooks, et al. (1994a). "Nigrostriatal function in vitamin E deficiency: clinical, experimental, and positron emission tomographic studies." Ann Neurol **35**(3): 298-303.
- Dexter, D. T., C. J. Carter, et al. (1989a). "Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease." J Neurochem **52**(2): 381-9.

- Dexter, D. T., A. E. Holley, et al. (1994b). "Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study." Mov Disord **9**(1): 92-7.
- Dexter, D. T., F. R. Wells, et al. (1989b). "Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease." J Neurochem **52**(6): 1830-6.
- Dodel, R. C., Y. Du, et al. (1998). "Peptide inhibitors of caspase-3-like proteases attenuate 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced toxicity of cultured fetal rat mesencephalic dopamine neurons." Neuroscience **86**(3): 701-7.
- Doucet, G., Y. Murata, et al. (1989). "Host afferents into intrastriatal transplants of fetal ventral mesencephalon." Exp Neurol **106**(1): 1-19.
- Doucet, J. P., Y. Nakabeppu, et al. (1996). "Chronic alterations in dopaminergic neurotransmission produce a persistent elevation of deltaFosB-like protein(s) in both the rodent and primate striatum." Eur J Neurosci **8**(2): 365-81.
- Dragunow, M., R. L. Faull, et al. (1995). "In situ evidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobes." Neuroreport **6**(7): 1053-7.
- Du, Y., Z. Ma, et al. (2001). "Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14669-74.
- Duan, W. M., R. M. Cameron, et al. (1997). "Rat intrastriatal neural allografts challenged with skin allografts at different time points." Exp Neurol **148**(1): 334-47.
- Dubois, B. (1993). "[Parkinsonian syndromes. Etiology, diagnosis, treatment]." Rev Prat **43**(18): 2439-44.
- Dunnett, S. B., A. Bjorklund, et al. (2001). "Cell therapy in Parkinson's disease - stop or go?" Nat Rev Neurosci **2**(5): 365-9.
- Duvoisin, R. C. (1986). "On heredity, twins, and Parkinson's disease." Ann Neurol **19**(4): 409-11.

E

- Eberhardt, O., R. V. Coelln, et al. (2000). "Protection by synergistic effects of adenovirus-mediated X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis and glial cell line-derived neurotrophic factor gene transfer in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease." J Neurosci **20**(24): 9126-34.
- Ernfors, P., K. F. Lee, et al. (1994). "Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits." Nature **368**(6467): 147-50.

F

- Fahn, S. (1998). "Medical treatment of Parkinson's disease." J Neurol **245**(11 Suppl 3): P15-24.
- Fahn, S. and G. Cohen (1992). "The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it." Ann Neurol **32**(6): 804-12.
- Faucheux, B. A., N. Nillesse, et al. (1995). "Expression of lactoferrin receptors is increased in the mesencephalon of patients with Parkinson disease." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9603-7.
- Feany, M. B. and W. W. Bender (2000). "A Drosophila model of Parkinson's disease." Nature **404**(6776): 394-8.
- Fearnley, J. M. and A. J. Lees (1991). "Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity." Brain **114** (Pt 5): 2283-301.
- Feger, J., M. Pessiglione, et al. (2002). "[Experimental models of Parkinson's disease]." Ann Pharm Fr **60**(1): 3-21.
- Fenelon, G. (1997). "[Diagnosis and course (under treatment) of Parkinson disease]." Rev Prat **47**(10): 1062-7.
- Ferrante, R. J., J. B. Schulz, et al. (1997). "Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and globus pallidus, but not in the substantia nigra." Brain Res **753**(1): 157-62.
- Forno, L. S., J. W. Langston, et al. (1988). "An electron microscopic study of MPTP-induced inclusion bodies in an old monkey." Brain Res **448**(1): 150-7.
- Forno, L. S., J. W. Langston, et al. (1986). "Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys." Ann Neurol **20**(4): 449-55.

- Francois, C., J. Yelnik, et al. (1999). "Dopaminergic cell group A8 in the monkey: anatomical organization and projections to the striatum." J Comp Neurol **414**(3): 334-47.
- Freed, C. R., P. E. Greene, et al. (2001). "Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease." N Engl J Med **344**(10): 710-9.
- Freeman, T. B., C. W. Olanow, et al. (1995). "Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommissural putamen in Parkinson's disease." Ann Neurol **38**(3): 379-88.
- Frim, D. M., T. A. Uhler, et al. (1994). "Implanted fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevent 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity to dopaminergic neurons in the rat." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 5104-8.
- Frohman, E. M., B. Vayuvegula, et al. (1988). "Norepinephrine inhibits gamma-interferon-induced major histocompatibility class II (Ia) antigen expression on cultured astrocytes via beta-2-adrenergic signal transduction mechanisms." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(4): 1292-6.

G

- Gash, D. M., Z. Zhang, et al. (1996). "Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF." Nature **380**(6571): 252-5.
- Gerlach, M. and P. Riederer (1996). "Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man." J Neural Transm **103**(8-9): 987-1041.
- German, D. C., K. Manaye, et al. (1989). "Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease: computer visualization." Ann Neurol **26**(4): 507-14.
- German, D. C. and K. F. Manaye (1993). "Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat." J Comp Neurol **331**(3): 297-309.
- Giasson, B. I., J. E. Duda, et al. (2000). "Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions." Science **290**(5493): 985-9.

- Giasson, B. I., J. E. Duda, et al. (2002). "Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein." Neuron **34**(4): 521-33.
- Gibb, W. R. and A. J. Lees (1989). "The significance of the Lewy body in the diagnosis of idiopathic Parkinson's disease." Neuropathol Appl Neurobiol **15**(1): 27-44.
- Gibb, W. R. and A. J. Lees (1991). "Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry **54**(5): 388-96.
- Gibb, W. R., T. Scott, et al. (1991). "Neuronal inclusions of Parkinson's disease." Mov Disord **6**(1): 2-11.
- Gill, S. S., N. K. Patel, et al. (2003). "Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease." Nat Med **9**(5): 589-95.
- Glazner, G. W., S. L. Chan, et al. (2000). "Caspase-mediated degradation of AMPA receptor subunits: a mechanism for preventing excitotoxic necrosis and ensuring apoptosis." J Neurosci **20**(10): 3641-9.
- Glinka, Y., M. Gassen, et al. (1997). "Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity." J Neural Transm Suppl **50**: 55-66.
- Goedert, M., M. G. Spillantini, et al. (1998). "Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases." Curr Opin Neurobiol **8**(5): 619-32.
- Goldman, J. E., S. H. Yen, et al. (1983). "Lewy bodies of Parkinson's disease contain neurofilament antigens." Science **221**(4615): 1082-4.
- Gomez-Mancilla, B. and P. J. Bedard (1993). "Effect of nondopaminergic drugs on L-dopa-induced dyskinesias in MPTP-treated monkeys." Clin Neuropharmacol **16**(5): 418-27.
- Goto, S., A. Hirano, et al. (1989). "Subdivisional involvement of nigrostriatal loop in idiopathic Parkinson's disease and striatonigral degeneration." Ann Neurol **26**(6): 766-70.
- Gouhier, C., S. Chalon, et al. (2002). "Protection of dopaminergic nigrostriatal afferents by GDNF delivered by microspheres in a rodent model of Parkinson's disease." Synapse **44**(3): 124-31.
- Graham, D. G., S. M. Tiffany, et al. (1978). "Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-

hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro." Mol Pharmacol **14**(4): 644-53.

- Granholm, A. C., J. L. Mott, et al. (1997). "Glial cell line-derived neurotrophic factor improves survival of ventral mesencephalic grafts to the 6-hydroxydopamine lesioned striatum." Exp Brain Res **116**(1): 29-38.
- Graybiel, A. M., E. C. Hirsch, et al. (1990a). "The nigrostriatal system in Parkinson's disease." Adv Neurol **53**: 17-29.
- Graybiel, A. M., R. Moratalla, et al. (1990b). "Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(17): 6912-6.
- Greenamyre, J. T., R. V. Eller, et al. (1994). "Antiparkinsonian effects of remacemide hydrochloride, a glutamate antagonist, in rodent and primate models of Parkinson's disease." Ann Neurol **35**(6): 655-61.
- group, T. P. s. s. (1993). "Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. The Parkinson Study Group." N Engl J Med **328**(3): 176-83.
- Grunblatt, E., S. Mandel, et al. (2000). "Neuroprotective strategies in Parkinson's disease using the models of 6-hydroxydopamine and MPTP." Ann N Y Acad Sci **899**: 262-73.
- Gubellini, P., B. Picconi, et al. (2002). "Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission." J Neurosci **22**(16): 6900-7.

H

- Haber, S. N. and J. L. Fudge (1997). "The primate substantia nigra and VTA: integrative circuitry and function." Crit Rev Neurobiol **11**(4): 323-42.
- Hagell, P. and P. Brundin (2001). "Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson disease." J Neuropathol Exp Neurol **60**(8): 741-52.
- Hagell, P., A. Schrag, et al. (1999). "Sequential bilateral transplantation in Parkinson's disease: effects of the second graft." Brain **122** (Pt 6): 1121-32.

- Hagell, P. and H. Widner (1999). "Clinical rating of dyskinesias in Parkinson's disease: use and reliability of a new rating scale." Mov Disord **14**(3): 448-55.
- Halliday, G. M., Y. W. Li, et al. (1990). "Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease." Ann Neurol **27**(4): 373-85.
- Hantraye, P., E. Brouillet, et al. (1996). "Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons." Nat Med **2**(9): 1017-21.
- Hartmann, A., S. Hunot, et al. (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): 2875-80.
- Hassouna, I., H. Wickert, et al. (1996). "Increase in bax expression in substantia nigra following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment of mice." Neurosci Lett **204**(1-2): 85-8.
- Hattori, N., M. Tanaka, et al. (1991). "Immunohistochemical studies on complexes I, II, III, and IV of mitochondria in Parkinson's disease." Ann Neurol **30**(4): 563-71.
- Hauser, R. A., T. B. Freeman, et al. (1999). "Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson disease." Arch Neurol **56**(2): 179-87.
- He, Y., S. Appel, et al. (2001). "Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum." Brain Res **909**(1-2): 187-93.
- Heikkila, R. E., B. A. Sieber, et al. (1989). "Some features of the nigrostriatal dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse." Mol Chem Neuropathol **10**(3): 171-83.
- Henderson, J. M., K. Carpenter, et al. (2000). "Degeneration of the centre median-parafascicular complex in Parkinson's disease." Ann Neurol **47**(3): 345-52.
- Heneka, M. T., T. Klockgether, et al. (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands reduce neuronal inducible nitric oxide synthase expression and cell death in vivo." J Neurosci **20**(18): 6862-7.
- Herman, J. P. and N. D. Abrous (1994). "Dopaminergic neural grafts after fifteen years: results and perspectives." Prog Neurobiol **44**(1): 1-35.

- Hirsch, E., A. M. Graybiel, et al. (1988). "Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease." Nature **334**(6180): 345-8.
- Hirsch, E. C., T. Breidert, et al. (2003). "The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease." Ann N Y Acad Sci **991**: 214-28.
- Hirsch, E. C., A. M. Graybiel, et al. (1987). "Neuronal loss in the pedunculopontine tegmental nucleus in Parkinson disease and in progressive supranuclear palsy." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(16): 5976-80.
- Hirsch, E. C., S. Hunot, et al. (1999). "Glial cell participation in the degeneration of dopaminergic neurons in Parkinson's disease." Adv Neurol **80**: 9-18.
- Hoffer, B. J., A. Hoffman, et al. (1994). "Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo." Neurosci Lett **182**(1): 107-11.
- Hornykiewicz, O. (1966). "Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function." Pharmacol Rev **18**(2): 925-64.
- Hudson, J. L., C. G. van Horne, et al. (1993). "Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats." Brain Res **626**(1-2): 167-74.
- Hunot, S., V. Bernard, et al. (1996). "Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) gene expression in the human brain: a post mortem in situ hybridization study with special reference to Parkinson's disease." J Neural Transm **103**(8-9): 1043-52.
- Hunot, S., B. Brugg, et al. (1997). "Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7531-6.
- Hunot, S., N. Dugas, et al. (1999). "FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells." J Neurosci **19**(9): 3440-7.
- Hyman, C., M. Juhasz, et al. (1994). "Overlapping and distinct actions of the neurotrophins BDNF, NT-3, and NT-4/5 on cultured dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalon." J Neurosci **14**(1): 335-47.

I

- Iacono, R. P., R. R. Lonser, et al. (1995). "Chronic anterior pallidal stimulation for Parkinson's disease." Acta Neurochir (Wien) **137**(1-2): 106-12.
- Inzelberg, R., P. Nisipeanu, et al. (1996). "Double-blind comparison of cabergoline and bromocriptine in Parkinson's disease patients with motor fluctuations." Neurology **47**(3): 785-8.
- Isacson, O. and T. Deacon (1997). "Neural transplantation studies reveal the brain's capacity for continuous reconstruction." Trends Neurosci **20**(10): 477-82.

J

- Jellinger, K. (1988). "The pedunculo-pontine nucleus in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry **51**(4): 540-3.
- Jellinger, K., W. Paulus, et al. (1990). "Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases." J Neural Transm Park Dis Dement Sect **2**(4): 327-40.
- Jellinger, K. A. (1991). "Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway." Mol Chem Neuropathol **14**(3): 153-97.
- Jenner, P. (2004). "Avoidance of dyskinesia: preclinical evidence for continuous dopaminergic stimulation." Neurology **62**(1 Suppl 1): S47-55.
- Jiang, C., A. T. Ting, et al. (1998). "PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines." Nature **391**(6662): 82-6.
- Joel, D. and I. Weiner (2000). "The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum." Neuroscience **96**(3): 451-74.

K

- Kahle, P. J., M. Neumann, et al. (2000). "Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha -synuclein in human and transgenic mouse brain." J Neurosci **20**(17): 6365-73.

- Kanda, T., M. J. Jackson, et al. (1998). "Adenosine A2A antagonist: a novel antiparkinsonian agent that does not provoke dyskinesia in parkinsonian monkeys." Ann Neurol **43**(4): 507-13.
- Kaufmann, W. E., P. F. Worley, et al. (1996). "COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(6): 2317-21.
- Kiefer, R., W. J. Streit, et al. (1995). "Transforming growth factor-beta 1: a lesion-associated cytokine of the nervous system." Int J Dev Neurosci **13**(3-4): 331-9.
- Kim, W. G., R. P. Mohny, et al. (2000). "Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia." J Neurosci **20**(16): 6309-16.
- Kirik, D., B. Georgievska, et al. (2004). "Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease." Nat Neurosci **7**(2): 105-10.
- Kirik, D., C. Rosenblad, et al. (1998). "Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat." Exp Neurol **152**(2): 259-77.
- Kish, S. J., K. Shannak, et al. (1988). "Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications." N Engl J Med **318**(14): 876-80.
- Kita, H. and S. T. Kitai (1987). "Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method." J Comp Neurol **260**(3): 435-52.
- Kitada, T., S. Asakawa, et al. (1998). "Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism." Nature **392**(6676): 605-8.
- Klockgether, T. and L. Turski (1990). "NMDA antagonists potentiate antiparkinsonian actions of L-dopa in monoamine-depleted rats." Ann Neurol **28**(4): 539-46.
- Klockgether, T., L. Turski, et al. (1991). "The AMPA receptor antagonist NBQX has antiparkinsonian effects in monoamine-depleted rats and MPTP-treated monkeys." Ann Neurol **30**(5): 717-23.

- Knoll, J. (1998). "(-)Deprenyl (selegiline), a catecholaminergic activity enhancer (CAE) substance acting in the brain." Pharmacol Toxicol **82**(2): 57-66.
- Knott, C., G. Stern, et al. (2000). "Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2." Mol Cell Neurosci **16**(6): 724-39.
- Kohutnicka, M., E. Lewandowska, et al. (1998). "Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)." Immunopharmacology **39**(3): 167-80.
- Kolata, G. (1983). "Monkey model of Parkinson's disease." Science **220**(4598): 705.
- Koller, W., N. Biary, et al. (1986). "Disability in essential tremor: effect of treatment." Neurology **36**(7): 1001-4.
- Koller, W. C. and E. Tolosa (1998). "Current and emerging drug therapies in the management of Parkinson's disease." Neurology **50**(6 Suppl 6): S1.
- Kordower, J. H., M. E. Emborg, et al. (2000). "Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease." Science **290**(5492): 767-73.
- Kordower, J. H., T. B. Freeman, et al. (1995). "Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease." N Engl J Med **332**(17): 1118-24.
- Kordower, J. H., S. Palfi, et al. (1999). "Clinicopathological findings following intraventricular glial-derived neurotrophic factor treatment in a patient with Parkinson's disease." Ann Neurol **46**(3): 419-24.
- Kornhuber, J., J. Bormann, et al. (1991). "Effects of the 1-amino-adamantanes at the MK-801-binding site of the NMDA-receptor-gated ion channel: a human postmortem brain study." Eur J Pharmacol **206**(4): 297-300.
- Kosel, S., R. Egensperger, et al. (1997). "On the question of apoptosis in the parkinsonian substantia nigra." Acta Neuropathol (Berl) **93**(2): 105-8.
- Kroemer, G., B. Dallaporta, et al. (1998). "The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis." Annu Rev Physiol **60**: 619-42.

- Kunzle, H. (1975). "Bilateral projections from precentral motor cortex to the putamen and other parts of the basal ganglia. An autoradiographic study in *Macaca fascicularis*." Brain Res **88**(2): 195-209.

L

- Lafon-Cazal, M., S. Pietri, et al. (1993). "NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity." Nature **364**(6437): 535-7.
- Lafont, F. and A. Prochiantz (1994). "Region-specific neuroastroglial interactions in neuronal morphogenesis and polarity: from homeogenic induction to cellular cytomorphogenesis." Perspect Dev Neurobiol **2**(3): 259-68.
- Lang, A. E. and A. M. Lozano (1998). "Parkinson's disease. First of two parts." N Engl J Med **339**(15): 1044-53.
- Langston, J. W. (1996). "The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story." Neurology **47**(6 Suppl 3): S153-60.
- Langston, J. W., P. Ballard, et al. (1983). "Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis." Science **219**(4587): 979-80.
- Langston, J. W. and P. A. Ballard, Jr. (1983). "Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine." N Engl J Med **309**(5): 310.
- Langston, J. W., L. S. Forno, et al. (1984). "Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey." Brain Res **292**(2): 390-4.
- Langston, J. W., L. S. Forno, et al. (1999). "Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure." Ann Neurol **46**(4): 598-605.
- Langston, J. W., M. Quik, et al. (2000). "Investigating levodopa-induced dyskinesias in the parkinsonian primate." Ann Neurol **47**(4 Suppl 1): S79-89.
- Lavoie, B. and A. Parent (1994). "Pedunculo-pontine nucleus in the squirrel monkey: cholinergic and glutamatergic projections to the substantia nigra." J Comp Neurol **344**(2): 232-41.
- Lawson, L. J., V. H. Perry, et al. (1990). "Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain." Neuroscience **39**(1): 151-70.

- Lawson, L. J., V. H. Perry, et al. (1993). "Microglial responses to physiological change: osmotic stress elevates DNA synthesis of neurohypophyseal microglia." Neuroscience **56**(4): 929-38.
- Le Couteur, D. G., A. J. McLean, et al. (1999). "Pesticides and Parkinson's disease." Biomed Pharmacother **53**(3): 122-30.
- Lee, C. S., M. A. Cenci, et al. (2000). "Embryonic ventral mesencephalic grafts improve levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease." Brain **123**(Pt 7): 1365-79.
- Lee, M. K., W. Stirling, et al. (2002). "Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8968-73.
- Lee, S. C., M. Collins, et al. (1992). "Glutamate differentially inhibits the expression of class II MHC antigens on astrocytes and microglia." J Immunol **148**(11): 3391-7.
- Lees, A. J., K. M. Shaw, et al. (1977). "Deprenyl in Parkinson's disease." Lancet **2**(8042): 791-5.
- Lees, A. J., K. M. Shaw, et al. (1978). "Baclofen in Parkinson's disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry **41**(8): 707-8.
- Leroy, E., R. Boyer, et al. (1998). "The ubiquitin pathway in Parkinson's disease." Nature **395**(6701): 451-2.
- Levi-Montalcini, R. (1987). "The nerve growth factor 35 years later." Science **237**(4819): 1154-62.
- Levivier, M., D. M. Gash, et al. (1995). "Time course of the neuroprotective effect of transplantation on quinolinic acid-induced lesions of the striatum." Neuroscience **69**(1): 43-50.
- Liberatore, G. T., V. Jackson-Lewis, et al. (1999). "Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease." Nat Med **5**(12): 1403-9.
- Limousin, P., J. Greene, et al. (1997). "Changes in cerebral activity pattern due to subthalamic nucleus or internal pallidum stimulation in Parkinson's disease." Ann Neurol **42**(3): 283-91.

- Lin, L. F., D. H. Doherty, et al. (1993). "GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons." Science **260**(5111): 1130-2.
- Lindner, M. D., C. K. Cain, et al. (1999). "Incomplete nigrostriatal dopaminergic cell loss and partial reductions in striatal dopamine produce akinesia, rigidity, tremor and cognitive deficits in middle-aged rats." Behav Brain Res **102**(1-2): 1-16.
- Lindvall, O., P. Brundin, et al. (1990). "Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease." Science **247**(4942): 574-7.
- Lindvall, O., S. Rehnström, et al. (1988). "Fetal dopamine-rich mesencephalic grafts in Parkinson's disease." Lancet **2**(8626-8627): 1483-4.
- Lindvall, O., G. Sawle, et al. (1994). "Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease." Ann Neurol **35**(2): 172-80.
- Lindvall, O., H. Widner, et al. (1992). "Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: one-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants." Ann Neurol **31**(2): 155-65.
- Liu, B., J. W. Jiang, et al. (2000). "Systemic infusion of naloxone reduces degeneration of rat substantia nigral dopaminergic neurons induced by intranigral injection of lipopolysaccharide." J Pharmacol Exp Ther **295**(1): 125-32.
- Liu, D., R. Yang, et al. (1994). "Hydroxyl radicals generated in vivo kill neurons in the rat spinal cord: electrophysiological, histological, and neurochemical results." J Neurochem **62**(1): 37-44.
- Lundblad, M., M. Andersson, et al. (2002). "Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease." Eur J Neurosci **15**(1): 120-32.

M

- Mann, D. M., P. O. Yates, et al. (1983). "The pathology of the human locus ceruleus." Clin Neuropathol **2**(1): 1-7.
- Marsden, C. D. and J. D. Parkes (1977). "Success and problems of long-term levodopa therapy in Parkinson's disease." Lancet **1**(8007): 345-9.
- Masliah, E., E. Rockenstein, et al. (2000). "Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders." Science **287**(5456): 1265-9.
- Matsuo, A., S. Nakamura, et al. (2000). "Immunohistochemical localization of glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha-1 in the rat brain: confirmation of expression in various neuronal systems." Brain Res **859**(1): 57-71.
- Matsuoka, Y., M. Vila, et al. (2001). "Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human alpha-synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter." Neurobiol Dis **8**(3): 535-9.
- Mattamall, M. B., R. Strong, et al. (1995). "Prostaglandin H synthetase-mediated metabolism of dopamine: implication for Parkinson's disease." J Neurochem **64**(4): 1645-54.
- Matthews, R. T., M. F. Beal, et al. (1997a). "MPP+ induced substantia nigra degeneration is attenuated in nNOS knockout mice." Neurobiol Dis **4**(2): 114-21.
- Matthews, R. T., L. Yang, et al. (1997b). "S-Methylthiocitrulline, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, protects against malonate and MPTP neurotoxicity." Exp Neurol **143**(2): 282-6.
- Mattson, M. P. (1998). "Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity." Trends Neurosci **21**(2): 53-7.
- Mattson, M. P. (2000). "Apoptosis in neurodegenerative disorders." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(2): 120-9.
- Mattson, M. P., B. Rychlik, et al. (1991). "Evidence for calcium-reducing and excitoprotective roles for the calcium-binding protein calbindin-D28k in cultured hippocampal neurons." Neuron **6**(1): 41-51.

- Matyszak, M. K., L. J. Lawson, et al. (1992). "Stromal macrophages of the choroid plexus situated at an interface between the brain and peripheral immune system constitutively express major histocompatibility class II antigens." J Neuroimmunol **40**(2-3): 173-81.
- Matzuk, M. M. and C. B. Saper (1985). "Preservation of hypothalamic dopaminergic neurons in Parkinson's disease." Ann Neurol **18**(5): 552-5.
- McGeer, P. L., S. Itagaki, et al. (1988). "Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains." Neurology **38**(8): 1285-91.
- McGrath, J., E. Lintz, et al. (2002). "Adeno-associated viral delivery of GDNF promotes recovery of dopaminergic phenotype following a unilateral 6-hydroxydopamine lesion." Cell Transplant **11**(3): 215-27.
- McKay, S. E., A. L. Purcell, et al. (1999). "Regulation of synaptic function by neurotrophic factors in vertebrates and invertebrates: implications for development and learning." Learn Mem **6**(3): 193-215.
- McNaught, K. S. and P. Jenner (2000). "Dysfunction of rat forebrain astrocytes in culture alters cytokine and neurotrophic factor release." Neurosci Lett **285**(1): 61-5.
- McNaught, K. S., D. P. Perl, et al. (2004). "Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease." Ann Neurol **56**(1): 149-62.
- McNaught, K. S., P. Shashidharan, et al. (2002). "Aggresome-related biogenesis of Lewy bodies." Eur J Neurosci **16**(11): 2136-48.
- Melchior, B., V. Nèrrière-Daguin, et al. (2003). "Ectopic expression of the TrkA receptor in adult dopaminergic mesencephalic neurons promotes retrograde axonal NGF transport and NGF-dependent neuroprotection." Exp Neurol **183**(2): 367-78.
- Mendez, J. S. and B. W. Finn (1975). "Use of 6-hydroxydopamine to create lesions in catecholamine neurons in rats." J Neurosurg **42**(2): 166-73.
- Menei, P., J. M. Pean, et al. (2000). "Intracerebral implantation of NGF-releasing biodegradable microspheres protects striatum against excitotoxic damage." Exp Neurol **161**(1): 259-72.

- Metz, G. A. and I. Q. Whishaw (2002). "Drug-induced rotation intensity in unilateral dopamine-depleted rats is not correlated with end point or qualitative measures of forelimb or hindlimb motor performance." Neuroscience **111**(2): 325-36.
- Michel, P. P., E. C. Hirsch, et al. (2002). "[Parkinson disease: mechanisms of cell death]." Rev Neurol (Paris) **158 Spec no 1**: S24-32.
- Michikawa, M., K. T. Lim, et al. (1994). "Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures." J Neurosci Res **37**(1): 62-70.
- Mochizuki, H., K. Goto, et al. (1996). "Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease." J Neurol Sci **137**(2): 120-3.
- Mogi, M., M. Harada, et al. (1996). "Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease." Neurosci Lett **211**(1): 13-6.
- Mogi, M., M. Harada, et al. (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): 208-10.
- Mogi, M., A. Togari, et al. (2000). "Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain." J Neural Transm **107**(3): 335-41.
- Moller, J. C., J. Sautter, et al. (1996). "Potential of neurotrophic factors in therapy of Parkinson's disease." J Neural Transm Suppl **48**: 103-12.
- Montoya, C. P., S. Astell, et al. (1990). "Effects of nigral and striatal grafts on skilled forelimb use in the rat." Prog Brain Res **82**: 459-66.
- Mouatt-Prigent, A., J. O. Karlsson, et al. (1996). "Increased M-calpain expression in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease but not in other neurodegenerative disorders involving the mesencephalon: a role in nerve cell death?" Neuroscience **73**(4): 979-87.
- Mouradian, M. M. (2002). "Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson disease." Neurology **58**(2): 179-85.
- Mukhida, K., K. A. Baker, et al. (2001). "Enhancement of sensorimotor behavioral recovery in hemiparkinsonian rats with intrastriatal, intranigral, and

intrasubthalamic nucleus dopaminergic transplants." J Neurosci **21**(10): 3521-30.

- Murer, M. G., G. Dziewczapolski, et al. (1998). "Chronic levodopa is not toxic for remaining dopamine neurons, but instead promotes their recovery, in rats with moderate nigrostriatal lesions." Ann Neurol **43**(5): 561-75.

N

- Nathan, C. and Q. W. Xie (1994). "Regulation of biosynthesis of nitric oxide." J Biol Chem **269**(19): 13725-8.
- Nutt, J. G. (1990). "Levodopa-induced dyskinesia: review, observations, and speculations." Neurology **40**(2): 340-5.
- Nutt, J. G., K. J. Burchiel, et al. (2003). "Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD." Neurology **60**(1): 69-73.

O

- O'Banion, M. K. (1999). "Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology." Crit Rev Neurobiol **13**(1): 45-82.
- Offen, D., P. M. Beart, et al. (1998). "Transgenic mice expressing human Bcl-2 in their neurons are resistant to 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine neurotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(10): 5789-94.
- Olanow, C. W., T. Freeman, et al. (2001). "Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease." N Engl J Med **345**(2): 146; author reply 147.
- Olanow, C. W., C. G. Goetz, et al. (2003). "A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease." Ann Neurol **54**(3): 403-14.
- Olanow, C. W., C. Mytilineou, et al. (1998). "Current status of selegiline as a neuroprotective agent in Parkinson's disease." Mov Disord **13 Suppl 1**: 55-8.
- Olsson, M., G. Nikkhah, et al. (1995). "Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test." J Neurosci **15**(5 Pt 2): 3863-75.

- Oppenheim, R. W. (1991). "Cell death during development of the nervous system." Annu Rev Neurosci **14**: 453-501.

P

- Parent, A. and B. Lavoie (1993). "The heterogeneity of the mesostriatal dopaminergic system as revealed in normal and parkinsonian monkeys." Adv Neurol **60**: 25-33.
- Parkes, J. D., R. C. Baxter, et al. (1974). "Comparative trial of benzhexol, amantadine, and levodopa in the treatment of Parkinson's disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry **37**(4): 422-6.
- Paxinos, G. and C. Watson (1982). The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney.
- Pearce, R. K., T. Banerji, et al. (1998). "De novo administration of ropinirole and bromocriptine induces less dyskinesia than L-dopa in the MPTP-treated marmoset." Mov Disord **13**(2): 234-41.
- Pennathur, S., V. Jackson-Lewis, et al. (1999). "Mass spectrometric quantification of 3-nitrotyrosine, ortho-tyrosine, and o,o'-dityrosine in brain tissue of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine-treated mice, a model of oxidative stress in Parkinson's disease." J Biol Chem **274**(49): 34621-8.
- Perese, D. A., J. Ulman, et al. (1989). "A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model." Brain Res **494**(2): 285-93.
- Perlow, M. J., W. J. Freed, et al. (1979). "Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system." Science **204**(4393): 643-7.
- Perry, T. L., D. V. Godin, et al. (1982). "Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency?" Neurosci Lett **33**(3): 305-10.
- Perry, V. H. and S. Gordon (1987). "Modulation of CD4 antigen on macrophages and microglia in rat brain." J Exp Med **166**(4): 1138-43.
- Perry, V. H., D. A. Hume, et al. (1985). "Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain." Neuroscience **15**(2): 313-26.
- Perry, V. H., M. K. Matyszak, et al. (1993). "Altered antigen expression of microglia in the aged rodent CNS." Glia **7**(1): 60-7.

- Peschanski, M., G. Defer, et al. (1994). "Bilateral motor improvement and alteration of L-dopa effect in two patients with Parkinson's disease following intrastriatal transplantation of foetal ventral mesencephalon." Brain **117 (Pt 3)**: 487-99.
- Piccini, P., D. J. Brooks, et al. (1999a). "Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient." Nat Neurosci **2(12)**: 1137-40.
- Piccini, P., D. J. Burn, et al. (1999b). "The role of inheritance in sporadic Parkinson's disease: evidence from a longitudinal study of dopaminergic function in twins." Ann Neurol **45(5)**: 577-82.
- Playford, E. D. and D. J. Brooks (1992). "In vivo and in vitro studies of the dopaminergic system in movement disorders." Cerebrovasc Brain Metab Rev **4(2)**: 144-71.
- Polymeropoulos, M. H., C. Lavedan, et al. (1997). "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease." Science **276(5321)**: 2045-7.
- Przedborski, S., Q. Chen, et al. (2001). "Oxidative post-translational modifications of alpha-synuclein in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of Parkinson's disease." J Neurochem **76(2)**: 637-40.
- Przedborski, S., V. Jackson-Lewis, et al. (1996). "Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **93(10)**: 4565-71.
- Przedborski, S., K. Tieu, et al. (2004). "MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease." J Bioenerg Biomembr **36(4)**: 375-9.

R

- Rascol, O. (1999). "[Arguments in favor of early treatment of Parkinson's disease with dopaminergic agonists]." Rev Neurol (Paris) **155(1)**: 35-42.
- Rascol, O., J. J. Ferreira, et al. (2002). "[Management of levodopa-induced dyskinesia]." Rev Neurol (Paris) **158(122)**: 117-124.
- Ray, C. D. and C. V. Burton (1980). "Deep brain stimulation for severe, chronic pain." Acta Neurochir Suppl (Wien) **30**: 289-93.

- Raz, A., E. Vaadia, et al. (2000). "Firing patterns and correlations of spontaneous discharge of pallidal neurons in the normal and the tremulous 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine vervet model of parkinsonism." J Neurosci **20**(22): 8559-71.
- Remy, P., Y. Samson, et al. (1995). "Clinical correlates of [18F]fluorodopa uptake in five grafted parkinsonian patients." Ann Neurol **38**(4): 580-8.
- Ricote, M., A. C. Li, et al. (1998). "The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation." Nature **391**(6662): 79-82.
- Riederer, P., E. Sofic, et al. (1989). "Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains." J Neurochem **52**(2): 515-20.
- Riederer, P. and M. B. Youdim (1986). "Monoamine oxidase activity and monoamine metabolism in brains of parkinsonian patients treated with l-deprenyl." J Neurochem **46**(5): 1359-65.
- Rodriguez, M. C., J. A. Obeso, et al. (1998). "Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection." Ann Neurol **44**(3 Suppl 1): S175-88.
- Rodter, A., C. Winkler, et al. (2000). "Complex sensorimotor behavioral changes after terminal striatal 6-OHDA lesion and transplantation of dopaminergic embryonic micrografts." Cell Transplant **9**(2): 197-214.
- Roedter, A., C. Winkler, et al. (2001). "Comparison of unilateral and bilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine-induced axon terminal lesions: evidence for interhemispheric functional coupling of the two nigrostriatal pathways." J Comp Neurol **432**(2): 217-29.
- Rosen, D. R., T. Siddique, et al. (1993). "Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis." Nature **362**(6415): 59-62.
- Rosenblad, C., D. Kirik, et al. (1999). "Protection and regeneration of nigral dopaminergic neurons by neurturin or GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease after administration into the striatum or the lateral ventricle." Eur J Neurosci **11**(5): 1554-66.
- Rothman, S. M., J. H. Thurston, et al. (1987). "Delayed neurotoxicity of excitatory amino acids in vitro." Neuroscience **22**(2): 471-80.

- Rousselet, E., J. Callebert, et al. (2002). "Role of TNF-alpha receptors in mice intoxicated with the parkinsonian toxin MPTP." Exp Neurol **177**(1): 183-92.

S

- Sahgal, A., J. S. Andrews, et al. (1984). "N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) affects locomotor activity without producing a nigrostriatal lesion in the rat." Neurosci Lett **48**(2): 179-84.
- Sastry, P. S. and K. S. Rao (2000). "Apoptosis and the nervous system." J Neurochem **74**(1): 1-20.
- Scherman, D., C. Desnos, et al. (1989). "Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging." Ann Neurol **26**(4): 551-7.
- Schierle, G. S., O. Hansson, et al. (1999). "Caspase inhibition reduces apoptosis and increases survival of nigral transplants." Nat Med **5**(1): 97-100.
- Schmidt, R. H., M. Ingvar, et al. (1982). "Functional activity of substantia nigra grafts reinnervating the striatum: neurotransmitter metabolism and [14C]2-deoxy-D-glucose autoradiography." J Neurochem **38**(3): 737-48.
- Schneider, J. S. (1989). "Levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys: relationship to extent of nigrostriatal damage." Pharmacol Biochem Behav **34**(1): 193-6.
- Schrag, A. and N. Quinn (2000). "Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study." Brain **123** (Pt 11): 2297-305.
- Schulz, J. B., R. T. Matthews, et al. (1995). "Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice." J Neurochem **64**(2): 936-9.
- Schwarting, R. K. and J. P. Huston (1996a). "The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments." Prog Neurobiol **50**(2-3): 275-331.
- Schwarting, R. K. and J. P. Huston (1996b). "Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae." Prog Neurobiol **49**(3): 215-66.
- Schwarz, J. (2003). "Rationale for dopamine agonist use as monotherapy in Parkinson's disease." Curr Opin Neurol **16 Suppl 1**: S27-33.

- Sedelis, M., R. K. Schwarting, et al. (2001). "Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease." Behav Brain Res **125**(1-2): 109-25.
- Sedgwick, J. D., S. Schwender, et al. (1991). "Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7438-42.
- Seibert, K., J. Masferrer, et al. (1995). "Mediation of inflammation by cyclooxygenase-2." Agents Actions Suppl **46**: 41-50.
- Semchuk, K. M., E. J. Love, et al. (1992). "Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals." Neurology **42**(7): 1328-35.
- Shoulson, I. (1998). "DATATOP: a decade of neuroprotective inquiry. Parkinson Study Group. Deprenyl And Tocopherol Antioxidative Therapy Of Parkinsonism." Ann Neurol **44**(3 Suppl 1): S160-6.
- Sian, J., D. T. Dexter, et al. (1994). "Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia." Ann Neurol **36**(3): 348-55.
- Siegfried, J. and B. Lippitz (1994). "Chronic electrical stimulation of the VL-VPL complex and of the pallidum in the treatment of movement disorders: personal experience since 1982." Stereotact Funct Neurosurg **62**(1-4): 71-5.
- Sminia, T., C. J. de Groot, et al. (1987). "Macrophages in the central nervous system of the rat." Immunobiology **174**(1): 43-50.
- Smith, Y. and J. Z. Kieval (2000). "Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia." Trends Neurosci **23**(10 Suppl): S28-33.
- Snyder, S. H. and R. J. D'Amato (1986). "MPTP: a neurotoxin relevant to the pathophysiology of Parkinson's disease. The 1985 George C. Cotzias lecture." Neurology **36**(2): 250-8.
- Sofic, E., W. Paulus, et al. (1991). "Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of parkinsonian brains." J Neurochem **56**(3): 978-82.
- Sonsalla, P. K., D. S. Albers, et al. (1998). "Role of glutamate in neurodegeneration of dopamine neurons in several animal models of parkinsonism." Amino Acids **14**(1-3): 69-74.

- Sonsalla, P. K., A. Giovanni, et al. (1992a). "Characteristics of dopaminergic neurotoxicity produced by MPTP and methamphetamine." Ann N Y Acad Sci **648**: 229-38.
- Sonsalla, P. K., G. D. Zeevalk, et al. (1992b). "MK-801 fails to protect against the dopaminergic neuropathology produced by systemic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice or intranigral 1-methyl-4-phenylpyridinium in rats." J Neurochem **58**(5): 1979-982.
- Sortwell, C. E., B. F. Daley, et al. (2000). "Oligodendrocyte-type 2 astrocyte-derived trophic factors increase survival of developing dopamine neurons through the inhibition of apoptotic cell death." J Comp Neurol **426**(1): 143-53.
- Spencer, P. S., D. N. Roy, et al. (1986). "Lathyrism: evidence for role of the neuroexcitatory aminoacid BOAA." Lancet **2**(8515): 1066-7.
- Spina, M. B. and G. Cohen (1989). "Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson disease." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(4): 1398-400.
- Spirduso, W. W., P. E. Gilliam, et al. (1985). "Reactive capacity: a sensitive behavioral marker of movement initiation and nigrostriatal dopamine function." Brain Res **335**(1): 45-54.
- Steece-Collier, K., T. J. Collier, et al. (2003). "Embryonic mesencephalic grafts increase levodopa-induced forelimb hyperkinesia in parkinsonian rats." Mov Disord **18**(12): 1442-54.
- Steece-Collier, K., E. Maries, et al. (2002). "Etiology of Parkinson's disease: Genetics and environment revisited." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 13972-4.
- Streit, W. J. (2002). "Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS." Glia **40**(2): 133-9.
- Streit, W. J., S. A. Walter, et al. (1999). "Reactive microgliosis." Prog Neurobiol **57**(6): 563-81.
- Swartz, H. M., T. Sarna, et al. (1992). "Modulation by neuromelanin of the availability and reactivity of metal ions." Ann Neurol **32 Suppl**: S69-75.

T

- Tasker, R. R., M. Munz, et al. (1997). "Deep brain stimulation and thalamotomy for tremor compared." Acta Neurochir Suppl **68**: 49-53.
- Tatton, N. A., A. Maclean-Fraser, et al. (1998). "A fluorescent double-labeling method to detect and confirm apoptotic nuclei in Parkinson's disease." Ann Neurol **44**(3 Suppl 1): S142-8.
- Tatton, W. G. and C. E. Greenwood (1991). "Rescue of dying neurons: a new action for deprenyl in MPTP parkinsonism." J Neurosci Res **30**(4): 666-72.
- Teismann, P. and B. Ferger (2001). "Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease." Synapse **39**(2): 167-74.
- Teismann, P., K. Tieu, et al. (2003). "Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease." Mov Disord **18**(2): 121-9.
- Tetud, J. W. and J. W. Langston (1989). "MPTP-induced parkinsonism as a model for Parkinson's disease." Acta Neurol Scand Suppl **126**: 35-40.
- Thoenen, H. and D. Edgar (1985). "Neurotrophic factors." Science **229**(4710): 238-42.
- Thoenen, H. and J. P. Tranzer (1968). "Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-Hydroxydopamine." Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol **261**(3): 271-88.
- Tolwani, R. J., M. W. Jakowec, et al. (1999). "Experimental models of Parkinson's disease: insights from many models." Lab Anim Sci **49**(4): 363-71.
- Tomac, A., E. Lindqvist, et al. (1995). "Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo." Nature **373**(6512): 335-9.
- Tompkins, M. M., E. J. Basgall, et al. (1997). "Apoptotic-like changes in Lewy-body-associated disorders and normal aging in substantia nigral neurons." Am J Pathol **150**(1): 119-31.
- Trimmer, P. A., T. S. Smith, et al. (1996). "Dopamine neurons from transgenic mice with a knockout of the p53 gene resist MPTP neurotoxicity." Neurodegeneration **5**(3): 233-9.
- Turski, L., K. Bressler, et al. (1991). "Protection of substantia nigra from MPP+ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists." Nature **349**(6308): 414-8.

U

- Uitti, R. J. (1998). "Medical treatment of essential tremor and Parkinson's disease." Geriatrics **53**(5): 46-8, 53-7.
- Ungerstedt, U. (1968). "6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons." Eur J Pharmacol **5**(1): 107-10.
- Ungerstedt, U. (1971). "Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour." Acta Physiol Scand Suppl **367**: 49-68.
- Ungerstedt, U. and G. W. Arbuthnott (1970). "Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system." Brain Res **24**(3): 485-93.

V

- van der Putten, H., K. H. Wiederhold, et al. (2000). "Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein." J Neurosci **20**(16): 6021-9.
- Viallet, F. (2000). "[Diagnostic criteria for idiopathic Parkinson's disease]." Rev Neurol (Paris) **156 Suppl 2 Pt 2**: 30-5.
- Vidailhet, M. (2000). "[Diagnostic criteria for Parkinson syndromes, expecting Parkinson's disease]." Rev Neurol (Paris) **156 Suppl 2 Pt 2**: 43-50.
- Vila, M., V. Jackson-Lewis, et al. (2001). "Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl- 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2837-42.

W

- Ward, C. D., R. C. Duvoisin, et al. (1983). "Parkinson's disease in 65 pairs of twins and in a set of quadruplets." Neurology **33**(7): 815-24.
- Wenning, G. K., P. Odin, et al. (1997). "Short- and long-term survival and function of unilateral intrastratial dopaminergic grafts in Parkinson's disease." Ann Neurol **42**(1): 95-107.
- Widner, H., J. Tetrud, et al. (1992). "Bilateral fetal mesencephalic grafting in two patients with parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)." N Engl J Med **327**(22): 1556-63.

- Wilder, P. J. and A. Rizzino (1993). "Mouse genetics in the 21st century: using gene targeting to create a cornucopia of mouse mutants possessing precise genetic modifications." Cytotechnology **11**(2): 79-99.
- Winkler, C., D. Kirik, et al. (2005). "Cell transplantation in Parkinson's disease: how can we make it work?" Trends Neurosci **28**(2): 86-92.
- Winkler, C., D. Kirik, et al. (2002). "L-DOPA-Induced Dyskinesia in the Intrastratial 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease: Relation to Motor and Cellular Parameters of Nigrostriatal Function." Neurobiol Dis **10**(2): 165-86.
- Winkler, C., D. Kirik, et al. (2000). "Transplantation in the rat model of Parkinson's disease: ectopic versus homotopic graft placement." Prog Brain Res **127**: 233-65.
- Wu, D. C., V. Jackson-Lewis, et al. (2002). "Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease." J Neurosci **22**(5): 1763-71.

X

- Xia, Y. and J. L. Zweier (1997). "Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 6954-8.

Y

- Yamada, T., P. L. McGeer, et al. (1990). "Relative sparing in Parkinson's disease of substantia nigra dopamine neurons containing calbindin-D28K." Brain Res **526**(2): 303-7.
- Yan, Q., C. Matheson, et al. (1995). "In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons." Nature **373**(6512): 341-4.
- Yang, L., R. T. Matthews, et al. (1998). "1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity is attenuated in mice overexpressing Bcl-2." J Neurosci **18**(20): 8145-52.
- Yurek, D. M. (1998). "Glial cell line-derived neurotrophic factor improves survival of dopaminergic neurons in transplants of fetal ventral mesencephalic tissue." Exp Neurol **153**(2): 195-202.

Z

- Zecca, L., M. B. Youdim, et al. (2004). "Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders." Nat Rev Neurosci **5**(11): 863-73.
- Zhang, P., P. Damier, et al. (1993). "Preferential expression of superoxide dismutase messenger RNA in melanized neurons in human mesencephalon." Neuroscience **55**(1): 167-75.
- Zuddas, A., G. Oberto, et al. (1992). "MK-801 prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in primates." J Neurochem **59**(2): 733-9.
- Zurn, A. D., H. R. Widmer, et al. (2001). "Sustained delivery of GDNF: towards a treatment for Parkinson's disease." Brain Res Brain Res Rev **36**(2-3): 222-9.

ADDENDUM

- Rémy S, Naveilhan P, Paillé V, Brachet P and Neveu I. *Lipopolysaccharide and $TNF\alpha$ regulate the expression of GDNF, neurturin and their receptors.* Neuroreport 2003 14 (11): 1529-34.

Résumé

Ce travail a conduit au développement d'un nouveau modèle de rat proche de la maladie de Parkinson humaine. Les animaux présentaient des troubles du comportement moteur spécifiques et quantifiables (stepping-test, rotarod) réversibles sous traitement par la L-DOPA. Sous ce traitement les animaux avec les altérations motrices les plus sévères développaient des dyskinésies. L'analyse histologique montrait des lésions de la substance noire prépondérantes dans la partie ventro-latérale. Une analyse corrélative a montré que les dyskinésies n'apparaissaient qu'à partir d'une valeur seuil de dénervation dopaminergique ; et que les scores du stepping-test constituaient un « indice moteur » prédictif du niveau lésionnel de l'animal et de la survenue des dyskinésies. L'analyse moléculaire du contexte trophique et microglial, par RT-PCR quantitative en temps réel (Taqman), suggère que la microglie aurait un rôle secondaire et plutôt neuroprotecteur dans ce modèle. Enfin, les résultats préliminaires, de greffes bilatérales dans ce modèle n'ont pas entraîné d'amélioration du score moteur, malgré la présence de greffons fonctionnels.

Mots clef: Parkinson, modèle, 6-OHDA, dyskinésies, greffes, L-DOPA, microglie, facteurs neurotrophiques, cytokines

Abstract

The objective of this work was to develop a rat model of Parkinson's disease closely resembling the human disease, in order to optimize the dopaminergic transmission. A bilateral model was developed, and presenting most of characteristics of the human disease. Its histological and behavioural analyses showed that the L-DOPA-induced-dyskinesias appeared only after a threshold of dopaminergic-cell loss; the stepping-test scores constitute a "motor index" predictive of the degree of dopaminergic-cell loss and also predictive of the occurrence of L-DOPA-induced-dyskinesias. The kinetic molecular analysis of the trophic and microglial background of this model showed that microglia would act rather in a late way in response to a significant neuronal death. Its role would be secondary and rather neuroprotector in this model. Finally, the preliminary results, of bilateral graft in this model did not improve the motor score despite functional grafts within the striatum and the substantia nigra.

Keywords: Parkinson, model, 6-OHDA, dyskinesias, graft, L-DOPA, microglia, neurotrophic factor, cytokine